

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**CONTRIBUCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE TH17 EN LA  
INFLAMACIÓN RENAL Y PERITONEAL**

**Tesis Doctoral**

**Raquel Rodrigues Díez**

**Madrid, 2012**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**CONTRIBUCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE TH17 EN LA  
INFLAMACIÓN RENAL Y PERITONEAL**

**Tesis Doctoral**

**Raquel Rodrigues Díez**

**Licenciada en Biología**

**Directores: Marta Ruiz-Ortega y Jesús Egido de los Ríos**

**Servicio de Nefrología e Hipertensión**

**Instituto de investigaciones Sanitarias Fundación Jiménez-Díaz**



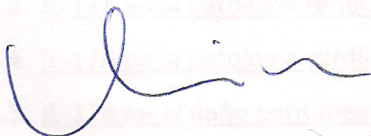


Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y  
Doña Marta Ruiz-Ortega, Profesor contratado Doctor de la Universidad Autónoma,

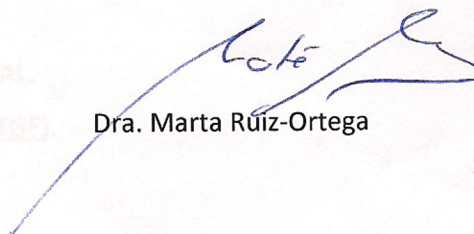
CERTIFICAN

Que Doña Raquel Rodríguez Díez, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Contribución de la respuesta inmune Th17 en la inflamación renal y peritoneal" que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

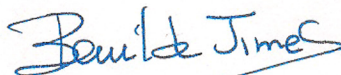
Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 27 de Abril de 2012



Dr. Jesús Egido de los Ríos



Dra. Marta Ruiz-Ortega



VºBº La tutora: Benilde Jiménez

Profesora Titular Dpto. Bioquímica UAM



*A mi familia*

*A Óscar*



*Felix qui potuit rerum cognoscere causas*  
"Afortunado el que es capaz de comprender el porqué de las cosas".  
-Virgilio, 21-70aC. *Geórgicas*, 2. 490-

*Somewhere, something incredible is waiting to be known.*  
*En algún sitio algo increíble espera ser descubierto.*  
– Carl Sagan, 1934 – 1996



*Tengo tantas cosas que agradecer y a tanta gente que me resulta muy difícil comenzar, espero no olvidarme de nadie y pido perdón de antemano por si me dejo a alguien.*

*En primer lugar me gustaría dar las gracias al Dr. Egido por acogerme en su laboratorio, esta gran familia, y por el esfuerzo que hace para encontrar un huequito (físico y mental) para tanta gente. En segundo lugar pero desde luego no por ello menos importante a Marta, muchas gracias por darme la oportunidad de investigar, por los buenos momentos que ha habido muchos y espero que siga habiendo, aunque alguna lagrimita también hemos soltado sobre todo con nuestro “querido” Gremlin, es que si no pongo algo de él en la tesis revienta... Cuando me marche se que a parte de una jefa dejaré una amiga. Y todo esto no habría tenido lugar sin María, muchas gracias por avisarme de que Marta buscaba a alguien.*

*Muchas Gracias a los veteranos, Carmen, Luis, José Luis, Óscar, por resolverme las dudas que he ido teniendo en estos años. A Alberto Ortiz, por tus comentarios y por las ideas que nos has dado cuando estábamos bloqueada muchas gracias. A Sebas a Esther y a Adrian por las comidas tan divertidas del “nofu”. A Rosario compañera del “zulo” por su discreción y su amabilidad.*

*Voy a continuar por mis compañeros, los que ya se marcharon, Rupi, que me enseñó a cultivar las celulitas a Van, que me enseñó a hacer inmunes ¡ya me sale el f4/80!, Jon que me enseñó los cultivos de vasculares y a ver el lado bueno de los resultados negativos, a Elsa que me enseñó todo lo demás y sobre todo que el trabajo duro tiene su recompensa. Me ayudasteis y me enseñasteis muchísimo que pena que os fuerais tan pronto espero haber aprendido lo mejor de cada uno. Por último a mi Gissellita me enseñaste a tener paciencia que es lo más importante, muchas gracias por acogerme en tu casa de Chile (todavía tengo la llaves). Espero que nos veamos pronto en algún lado del charco. A Cecile, espero que nos veamos en Paris. Javi, Sandra espero que os esté yendo bien. Al resto de gente que se ha ido, que han sido muchos, Alfi y Julio aunque os fuisteis los primeros sois a los que más veo aunque sea en los States, Eva, Cris, os perdí la pista pero espero volver a veros. Bego, Ros, Lupe, me lo pasé genial en San Sebastián. Vir, mi compi de pipetas, Alberto y Álvaro, no me olvido de Salamanca (que buenos ratos). Bea a ti todavía te veo de vez en cuando. A todos espero que os vaya muy bien allí donde vayáis, y que seguro que sí!*

*Ahora mis compis actuales, sabéis que os aprecio muchísimo aunque os gruña de vez en cuando, nos preocupéis que cuando me vaya os dejaré una lista con todo lo que tengo y donde está guardado (jeje). Sandra mi compi de congresos me he reído muchísimo contigo, ya lo sabes, y a pesar de las primeras impresiones no soy tan borde y sé que me has cogido cariño aunque te metas conmigo y con mis libracos. Mi Chilenita prefería Caro siento dejarte le legado de... (ya lo he puesto una vez y más da mala suerte) mucha suerte con todo y espero que alguna vez nos juntemos en Chile (pero de vacaciones eh). Matilde, Mati muchas gracias por ser como eres, ojala hubiera gente tan buena como tú. Pepe y Maca tenéis buenos maestros (les he enseñado yo! Es broma) sabéis que podéis contar conmigo para lo que queráis a partir de ahora estaré más relajada. Ana, que buena adquisición! Desprendes buen rollo por*

*donde pasas muchas gracias por tus palabras de apoyo, bueno muchas gracias a todos por vuestro apoyo. Y el último de mi grupo, Raúl no sé en qué apartado ponerte, en el de compañeros, familia, en el de amigos sea en el que sea en todos ellos eres el mejor... Muchas gracias por todo, aunque sea una larga historia sin ti yo no estaría aquí, te acuerdas cuando cogiste el anuncio de María de que buscaba gente (y arrancaste todos los demás... tú eres así) aunque parezcas tan borde eres la persona más generosa que conozco, muchas gracias por Ray, es el mejor regalo que me han hecho, probablemente nos separaremos pronto pero no olvides que "you never walk alone".*

*Priscila, ánimo que si yo he llegado hasta aquí tú también y recuerda que tú vales mucho. Marian que pena que te fueras, pero me alegro de que te vaya tan bien. Susana que haría sin ti, que haríamos sin ti! Jonay espero que eso que estáis preparando sea tan divertido como parece. Patri eres un encanto. Tarín y por supuesto Cris muchas gracias por vuestro humor, sois muy divertidos.*

*Ana eres una gran compañera, que siempre encuentra un hueco para los demás ha sido un placer trabajar en el laboratorio contigo. Loli ya vuelves!! Juan espero que Andrés no te de mucha guerra y no salga tan juerguista como tú. Sara, Conchi, Beñat, ya os queda menos, esto llega rápido. Julio a ti ni te cuento. Sergio creo que a ti también. Mucha Suerte. Y a los demás Elena, Kike, Ainoa, Carlota, Valva, Irene, Iolanda, Belén, Christian, Ernesto, Alfonso, Olga, que tengáis mucha suerte. Elisa quien nos iba a decir que acabaríamos juntas de nuevo... no te agobies vale?*

*A Curra, por enseñarme a manejar el confocal que al principio me parecía tan difícil y por tus charlas. Laura, muchas gracias, a veces nos olvidamos de que los pedidos no se hacen solos.*

*Gracias también a la gente de los otros labos, Charly, Irene, Lidia, la gente de Pedro Esbrit, Dani, Luis, Ana y todos los demás mucha gracias por dejarnos todos lo que os hemos pedido estos años.*

*A la gente de la Paz, Dr. Selgas, Auxi, muchas gracias por dejarme las muestras sin las que esta tesis no habría sido posible y también a Pepe de Puerta de Hierro. A Lupe, Luiz, por todo su apoyo con los modelos, por quedarse conmigo hasta las mil, que injusta es la vida... A Manolo y a Jesús no me olvidaré del congreso de Arizona.*

*A la gente de Chile, en especial al Dr. Mezzano, muchas gracias Sergio por portarte tan bien conmigo y tomarte tantas molestias, tengo la bandurria en primer lugar en mi salón. No me olvidaré del volcán tan soleado, que pena que Jesús no lo haya visto (jeje). Alejandra, M<sup>a</sup> Eugenia, Graciela, muchas gracias por acogerme. Espero volver para "carretear" y "vitriñar" con ustedes. Paola y Lenny, muchas gracias a vosotros también espero que les vaya bien en Barcelona.*

*A mis amigos, mis hermanos. Paquito, ya sé que no me vas a diseñar la portada y si lo haces me como la tesis (queda escrito). Yoli! Quien te lo iba a decir, la vueltas que da la vida... me alegro mucho por vosotros, a ver si estrenamos vuestro piso pronto. Lour... mi pequeña, que te quiero mucho niña y con esto lo digo todo. Pon, por la tercera. Dani que siempre tiene razón cuando me da la razón y Anita vainas, no cambies nunca, muchas gracias, por los buenos ratos que hemos pasado y los que pasaremos, si sobrevivimos al viaje de Amsterdam sin dejar de hablarnos podemos con todo. Juan, Piquero, ya sé que*



*esta tesis no es tan necesaria para el mundo como tu diccionario de Griego-Micénico pero que le vamos a hacer, tiene que haber de todo. Gracias a todos por esos que ratos pasamos arreglando el mundo “cortando trajes” y cerrando bares (cada vez menos que nos hacemos mayores) espero que haya muchos más. Y a los demás Bea, Felipe, Pelos bueno a toda la Brecha y a los Destroyer. Diana, Inma, Bea aunque sea muy de vez en cuando agradezco mucho esos cafés y las Charlas en la Sepul. A mis compañeros de los viajes, especialmente a Bernardo y Marga, y todos los demás, ya sabéis quienes soy, no me cabéis todos. Muchas gracias por esos tés en Damasco, esas pipas en Alepho (que quedará de ellas)...*

*Ya estoy terminando... A mi familia, a mis padres, no se puede tener unos padres mejores, me habéis apoyado en todo lo que he hecho, mamá ya sé que te pusiste muy triste cuando me fui, lo siento, pero míralo por el lado bueno, aprendiste a nadar... con el miedo que te daba el agua. Me habéis enseñado a ser como soy, a conseguir lo que me propongo, y sobre todo a no rendirme os quiero mucho. Y al resto de mis familia, a mis tías primos, May que pena que nos dejaras... ojala hubiera pasado más tiempo contigo. Abuela Paz gracias por todo.*

*Y por último el más importante, Óscar, te quiero, te quiero mucho aunque me saques de mis casillas, supongo que es por eso. Muchas Gracias por aguantarme en los buenos y en los malos momentos. No sé qué haría sin ti. Tú haces que quiera ser mejor persona. Gracias por hacerme reír. Gracias por nuestros viajes por compartir tu vida conmigo. La próxima vez que me vaya lejos te vienes conmigo vale? Espero no dejarme a nadie, si ha sido así que me disculpe. No era mi intención.*

*Y muchas Gracias a ti, que te has tomado la molestia de leer estás página.*

*Raquel*



<b>I. ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>II. RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>7</b>
<b>1. LA ENFERMEDAD RENAL.</b>	<b>7</b>
<b>2. MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES IMPLICADOS EN EL INICIO Y PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL.</b>	<b>7</b>
2.1 <u>La respuesta inflamatoria.</u>	7
2.1.1. El proceso inflamatorio renal.	8
2.2. <u>Descripción del proceso fibrótico.</u>	10
<b>3. TERAPIAS EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA: DIÁLISIS PERITONEAL.</b>	<b>11</b>
<b>4. LA RESPUESTA INMUNE.</b>	<b>13</b>
4.1 <u>Diferenciación de células CD4.</u>	13
4.1.1. Respuesta Th1 y Th2.	13
4.1.2. Respuesta Th17.	14
4.1.3. Respuesta T reguladora (Treg).	15
<b>5. INTERLUQUINA 17A (IL-17A): CITOQUINA EJECTORA EN LA RESPUESTA TH17.</b>	<b>17</b>
5.1. <u>Familia IL-17.</u>	17
5.2. <u>Estructura de los receptores y vías de señalización de IL-17A.</u>	18
5.3. <u>IL-17A en la patología renal.</u>	19
5.4. <u>IL-17A en la patología cardio-vascular.</u>	21
5.5. <u>IL-17A y diálisis peritoneal</u>	21
<b>6. FACTORES CLAVES IMPLICADOS EN EL DAÑO RENAL.</b>	<b>21</b>
6.1. <u>Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF).</u>	21
6.1.1. Familia CCN.	21
6.1.2. CTGF.	22
6.2. <u>Factor de Crecimiento Transformante <math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>).</u>	24
<b>IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.</b>	<b>27</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>29</b>
<b>1. MODELOS EXPERIMENTALES.</b>	<b>29</b>
1.1. <u>Modelo experimental de administración sistémica de CTGF en ratón.</u>	29
1.1.1. Neutralización de IL-17A y de TGF- $\beta$ .	30
1.2. <u>Modelos experimentales de daño renal en rata.</u>	31
1.2.1. Modelo de infusión de Angiotensina II.	31

1.2.2.	Modelo de nefropatía diabética por administración de STZ.	31
1.2.3.	Ratas espontáneamente hipertensas.	32
1.3.	<u>Modelo de obstrucción unilateral del uréter. Bloqueo de IL-17A.</u>	32
1.4.	<u>Modelo experimental de daño peritoneal por instilación de líquido de diálisis en ratón.</u>	33
1.4.1.	Neutralización de IL-17A.	33
1.5.	<u>Modelo experimental de daño peritoneal por inyección de IL-17A en ratón.</u>	34
<b>2.</b>	<b>ESTUDIOS EN PACIENTES.</b>	<b>35</b>
2.1.	<u>Obtención de muestras histológicas.</u>	35
2.2.	<u>Muestras de efluente.</u>	
<b>3.</b>	<b>ENSAYOS IN VITRO.</b>	35
<b>4.</b>	<b>ESTUDIOS MORFOLOGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS.</b>	<b>36</b>
4.1.	<u>Estudios morfológicos.</u>	36
4.2.	<u>Estudios inmunohistoquímicos.</u>	36
4.3.	<u>Inmunofluorescencia.</u>	37
<b>5.</b>	<b>ANÁLISIS PROTEICOS.</b>	<b>38</b>
5.1.	<u>Técnica de ELISA.</u>	38
5.2.	<u>Técnica de Western Blot.</u>	38
<b>6.</b>	<b>ANÁLISIS GENÉTICOS.</b>	<b>39</b>
<b>7.</b>	<b>CITOMETRÍA DE FLUJO.</b>	<b>40</b>
<b>8.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b>	<b>41</b>
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS.</b>	<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>ESTUDIOS EXPERIMENTALES DEL EFECTO <i>IN VIVO</i> DE CTGF.</b>	<b>43</b>
1.1.	<u>Efecto de la administración sistémica de CTGF en la morfología y función renal en ratón.</u>	43
1.2.	<u>CTGF induce una respuesta inflamatoria crónica en el riñón.</u>	44
1.3.	<u>CTGF induce una respuesta fibrótica transitoria renal que desaparece a los 10 días.</u>	45
1.4.	<u>Caracterización de la respuesta inflamatoria inducida por CTGF en el riñón.</u>	47
1.4.1.	Evaluación de las citoquinas características de las respuestas inflamatorias Th1, Th2 y Th17.	47
1.4.2.	CTGF activa factores relacionados con la respuesta Th17 en el riñón	50
1.4.3.	CTGF no induce activación renal de factores relacionados con la respuesta Treg.	51
1.5.	<u>El bloqueo de IL-17A inhibe la respuesta inflamatoria renal inducida por CTGF.</u>	51
1.6.	<u>Efecto de la administración sistémica de CTGF en aorta.</u>	53
1.6.1.	CTGF induce una respuesta inflamatoria Th17 en aorta.	53
1.6.2.	CTGF no induce una respuesta fibrótica vascular.	54

1.7. <u>El bloqueo de IL-17A inhibe el aumento de factores proinflamatorios inducidos por CTGF en aorta.</u>	55
1.8. <u>CTGF no regula la respuesta Th17/Treg periférica.</u>	55
<b>2. EFECTO DEL BLOQUEO DE TGF-<math>\beta</math> EN LAS ACCIONES DE CTGF.</b>	<b>56</b>
2.1. <u>La administración de un anticuerpo neutralizante de TGF-<math>\beta</math> activo aumenta la respuesta inflamatoria inducida por CTGF en riñón y aorta.</u>	57
2.2. <u>La inhibición de TGF-<math>\beta</math> disminuye el número de células Treg y aumenta el de linfocitos citotóxicos circulantes.</u>	58
<b>3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE IL-17A EN OTROS MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO RENAL.</b>	<b>59</b>
<b>4. EFECTO DEL BLOQUEO DE LA RESPUESTA TH17 EN EL MODELO DE DAÑO RENAL POR OBSTRUCCIÓN UNILATERAL DEL URETER.</b>	<b>59</b>
<b>5. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA RESPUESTA TH17 EN PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA.</b>	<b>60</b>
<b>6. PAPEL DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA TH17 EN EL DAÑO PERITONEAL.</b>	<b>61</b>
6.1. <u>Estudio de la respuesta Th17 en pacientes en diálisis peritoneal.</u>	61
6.1.1. Presencia de células IL-17A positivas en biopsias peritoneales.	61
6.1.2. Los pacientes en diálisis peritoneal presenta niveles elevados de IL-17A en el efluente.	63
6.2. <u>Estudio de la respuesta Th17 en el modelo experimental de daño peritoneal causado por exposición a líquido de diálisis.</u>	64
6.2.1. Caracterización del proceso inflamatorio en el peritoneo dañado.	64
6.2.2. La exposición crónica a líquido de diálisis induce un aumento de la producción local de IL-17A.	66
6.2.3. Activación de citoquinas y factores de transcripción relacionados con la respuesta Th17 en el peritoneo dañado.	68
6.3. <u>La inhibición de IL-17A disminuye el infiltrado inflamatorio peritoneal causado por exposición a líquido de diálisis.</u>	69
<b>7. ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO <i>IN VIVO</i> DE IL-17A EL PERITONEO DE RATÓN.</b>	<b>70</b>
7.1. <u>IL-17A <i>in vivo</i> causa una respuesta inflamatoria en el peritoneo.</u>	71
7.2. <u>IL-17A induce factores proangiogénicos y profibróticos en el peritoneo.</u>	72
<b>8. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE LA RESPUESTA DE IL-17A.</b>	<b>72</b>
8.1. <u>Efecto de IL-17A en células renales.</u>	72
8.2. <u>Efecto de IL-17A en células mesoteliales humanas.</u>	73

VII.	DISCUSIÓN.	75
VIII.	CONCLUSIONES.	89
IX.	BIBLIOGRAFÍA.	91
X.	ANEXOS.	115

## I. CLAVE DE ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

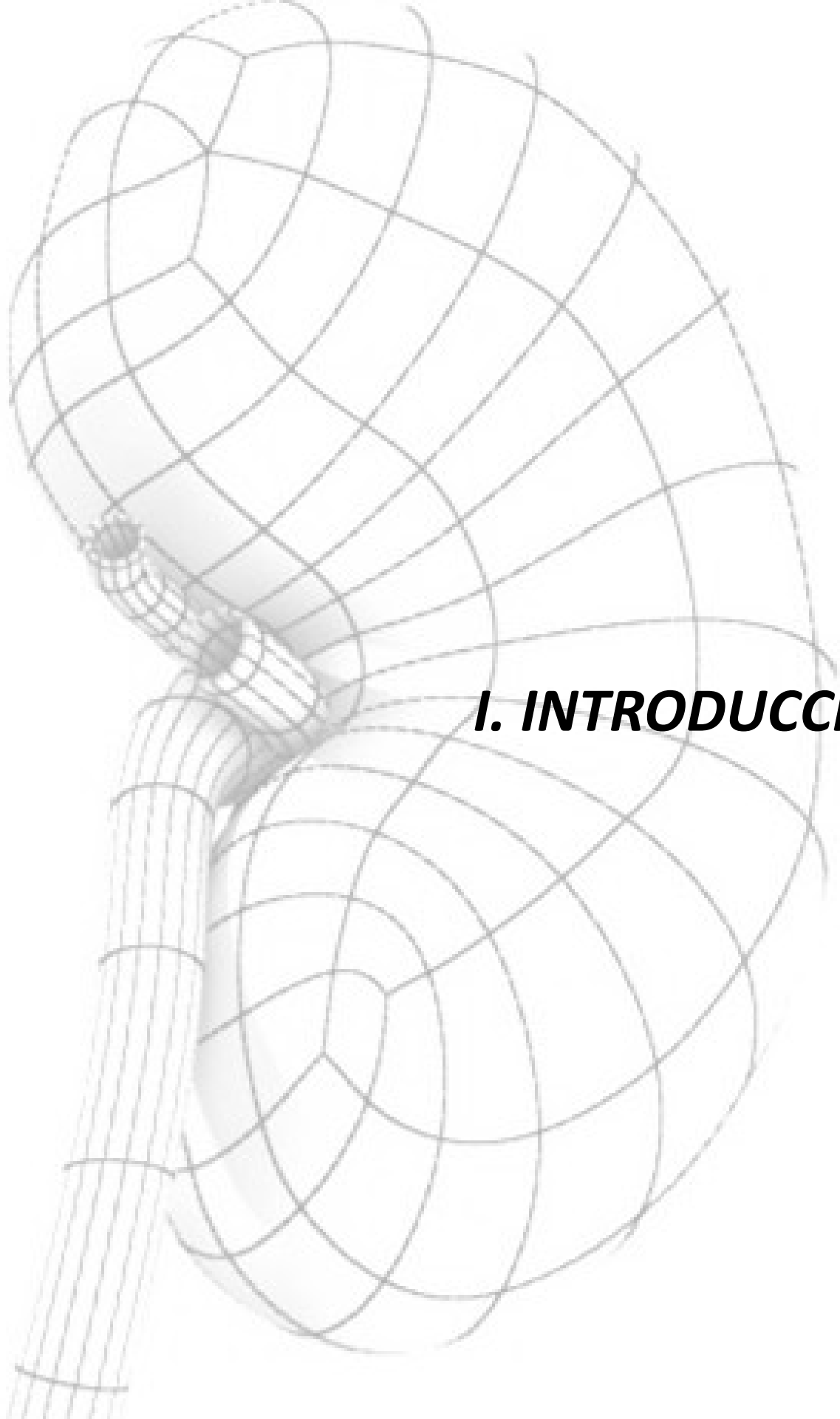
ACT1	Activador 1 de NF kappa B
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIRE	gen regulador autoinmune.
ANCA	Anticuerpos citoplásmaticos anti neutrófilos.
Ang II	Angiotensina II
AP-1	Proteína activada 1
ApoE-/-	Ratón deficiente en Apolipoproteína E.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero
AT1	Receptor tipo 1 de Ang II.
BMP	Proteína morfogenética del hueso
BSA	Albúmina de suero bovino
C/EBP	Proteínas potenciadoras de unión a CCAAT
CBAD	Dominio de activación de C/EBPβ
CCR2	Receptor de MPC-1 (CCL2)
CMLV	Células de músculo liso vascular
Col-1	Colágeno tipo 1
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta adenosina monofosfato cíclico
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CTLA-8	Antígeno asociado a linfocitos citotóxicos 8.
Cyr61	CCN1. Proteína rica en cisteína 61.
DTT	Ditiotreitol
DP	Diálisis peritoneal.
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidermico
ELISA	Del inglés: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERC	Enfermedad renal crónica
ERK1/2	Quinasa de regulada por señales extracelulares 1/2
ET-1	Endotelina-1
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico.
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FN	Fibronectina
Foxp3	Del inglés: forkhead box P3
Fsp-1	Proteína específica de fibroblasto

GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato dehidrogenasa
G-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos.
GM-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos.
GRO- $\alpha$	CXCL1. CK. Oncogen relacionado con el crecimiento $\alpha$ .
HIF-1	Factor inducible por hipoxia1
HK-2	Células túbuloepiteliales proximales humanas inmortalizadas
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
iECAS	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleuquina
IL-17R	Receptor de interleuquina 17
ILK	Quinasa ligada a Integrinas
iNOs	Sintasa de óxido nítrico inducible.
IPEX	inmunodeficiencia poliendocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X
JNK1/2	Quinasa NH2 terminal de c-jun 1/2
KCl	Cloruro potásico
LAP	Péptido asociado a latencia
LTBP	Proteína de unión al TGF- $\beta$ latente
LTi	Células inductoras de tejido linfoide.
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MCP-1	CCL2. Proteína quimioattractante de monocitos-1
MCP-3	CCL7. Proteína quimioattractante de monocitos-3.
MCT	Células túbuloepiteliales proximal de ratón.
MEC	Matriz extracelular
MIP-1 $\alpha$	CCL3. Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
MIP-2 $\alpha$	CXCL2. Proteína inflamatoria de macrófagos 2 alfa
MMPs	Metaloproteasa de matriz.
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear de transcripción $\kappa$ B
NK	Del inglés Natural Killer
NOV	CCN3. Proteína sobreexpresada en nefroblastoma.
PAGE	Corresponde a las siglas del inglés: Poliacrilamide gel electrophoresis
PAI-1	Inhibidor de Activador del Plasminógeno 1
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDG	Productos de degradación de glucosa



PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGs	Productos de degradación de glucosa.
PDTC	Pirrolidin-ditiocarbamato
PFGAs	Productos finales de glicación avanzada.
PI3K	Quinasa de fosfatidilinositol 3 fosfato.
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PTHrP	Proteína relacionada con la hormona
PTK	Proteínas tirosina quinasas
RANTES	CCL5. Proteína regulada sobre activación: expresada y secretada por células T.
REDOX	Reacciones de óxido-reducción
ROCK	Quinasa de Rho
RORyt	Factor de transcripción de tipo huérfano del receptor de ácido retinoico gamma t.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Del inglés: Rapid Prototyping and Manufacturing Institute
SEFIR	Dominio de expresión del receptor de IL-17 similar al del receptor FGF
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SRA	Sistema Renina Angiotensina
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
STAT	Del inglés: Proteínas activadoras de la transcripción y transductores de la señal.
TBS	Tampón Tris salino
TEM	Transición Epitelio-Mesénquimal
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Respuesta de células T colaboradoras (helper) 1
Th17	Respuesta de células T colaboradoras (helper) 17
Th2	Respuesta de células T colaboradoras (helper) 2
TILL	Del inglés: TIR-like loop
TIR	Dominios del receptor de IL-1 $\beta$ parecidos a Toll
TLR	Receptores parecidos a Toll
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF.
Treg	Respuesta de células T reguladoras
TRI	Receptor de TGF- $\beta$ tipo I
TRII	Receptor de TGF- $\beta$ tipo II
TSP-1	Trombospondina-1
UUO	Obstrucción unilateral de uréter
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WB	Western Blot
WISP	Proteínas secretadas inducidas por Wnt-1.
$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso alfa,
STZ.	Streptozotocina.





## ***I. INTRODUCCIÓN***



## 1. ENFERMEDAD RENAL: SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA

La incidencia de la Enfermedad Renal Crónica (ERC) es un problema de salud pública importante en los países desarrollados. Hay muchos tipos de daño que pueden dar origen a un fallo renal, daños de tipo inmunológico (nefropatía por inmunoglobulina A, nefritis lúpica, enfermedad de Goodpasture), por isquemia (shock), exposición a tóxicos (drogas o infecciones bacterianas o víricas), metabólico (nefropatía diabética) o hemodinámico (hipertensión) (Lee SB 2010); siendo estas dos últimas, la diabetes y la hipertensión arterial, las responsables de la mayoría de los casos de ERC (Mezzano SA 2005). Se calcula que en España esta enfermedad afecta, en mayor o menor grado, a un 11% de la población adulta (estudio EPIRC). Uno de los mayores problemas actuales es el número creciente de pacientes que progresan hasta insuficiencia renal terminal y requieren tratamiento de sustitución mediante diálisis (hemodiálisis o diálisis peritoneal) y posteriormente trasplante, lo que conlleva un deterioro en la calidad de vida de estos pacientes y un alto coste para los sistemas de salud (Alcázar R 2008). A pesar de los numerosos avances terapéuticos, los pacientes con enfermedad renal terminal siguen presentando una elevada incidencia de enfermedad cardiovascular y una mayor morbi-mortalidad debido a accidentes cerebro-vasculares (Matsushita K 2010) que no pueden ser explicadas por los factores de riesgo tradicionales (dislipidemia, hipertensión o tabaquismo) pero que, sin embargo, sí parecen tener relación con otros factores, como son la inflamación o el estrés oxidativo (USRDS 1997, Cheung AK 2000, Ross R 1999, Go AS 2004, Lai NK 2010). Numerosos estudios han demostrado la existencia de mecanismos capaces de afectar de forma bidireccional al sistema renal y al cardiovascular. Entre los mecanismos que afectan a ambos sistemas se encuentran la activación del sistema simpático, del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), alteraciones en la biodisponibilidad del óxido nítrico, inflamación y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (Cruz DN 2010, Zoccali C 2011). El uso terapéutico de inhibidores de estas vías ha demostrado un efecto beneficioso en pacientes con enfermedad renal y/o cardiovascular lo que demuestra la estrecha relación entre ambos sistemas (Zoccali C 2011). Entre ellos destacan los fármacos que bloquean el SRAA que han demostrado efectos beneficiosos, como el control de la presión arterial y la reducción de proteinuria y efectos órganoprotectores. Sin embargo, los actuales tratamientos empleados en clínica sólo consiguen frenar la progresión del daño hasta el fallo renal terminal, pero no revierten las lesiones. Todo esto hace evidente la necesidad e importancia de estudiar los mecanismos moleculares que conllevan a la insuficiencia renal crónica y sus posibles dianas y tratamientos para minimizar su progresión y tratar las complicaciones derivadas.

## 2. MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES IMPLICADOS EN EL INICIO Y LA PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL.

### 2.1. LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Independientemente de la lesión inicial de un tejido, la reparación del daño siempre se asocia con un proceso inflamatorio, tanto si el resultado final es la recuperación como si deriva en fibrosis. La

La inflamación es una reacción normal de los órganos y tejidos para protegerse y defenderse contra una gran variedad de agentes tóxicos o patológicos (lesiones o infecciones virales y bacterianas). Normalmente la inflamación es un proceso regulado y transitorio, con efectos beneficiosos que conduce a la reparación del tejido. Sin embargo, la inflamación sostenida o sin control es la causa subyacente que contribuye activamente a la progresión de muchas patologías como diabetes, artritis, enfermedades neuroinflamatorias y renales, enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis; y estados patológicos como la obesidad, la desnutrición e incluso el envejecimiento (Papanicolaou DA 2000, Kular L 2011).

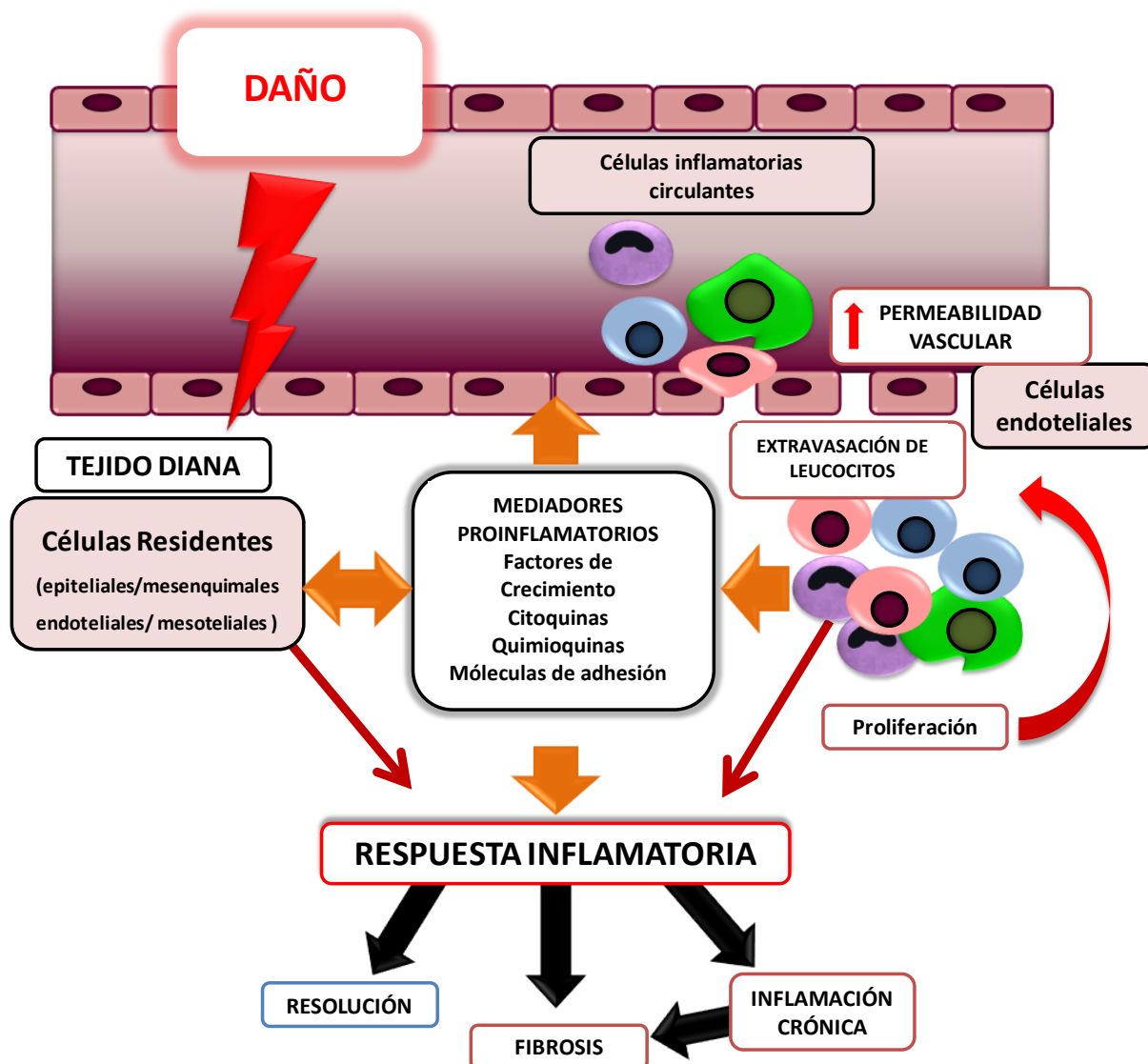
La patogénesis de la inflamación es un proceso complejo que implica varios pasos. De forma general, cuando se produce un daño o infección, las células afectadas comienzan a liberar mediadores como quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión, que activan a las células del endotelio generando una serie de cambios a nivel vascular, se modifica el calibre del vaso y el flujo vascular, lo que permite una mayor afluencia de sangre a la zona de la lesión, y aumenta la permeabilidad vascular (Bataller R 2005). La liberación de moléculas y cuerpos apoptóticos liberados por las células dañadas también activan a las células circulantes del sistema inmune, se produce entonces el reclutamiento, adhesión y extravasación de leucocitos a través de la pared vascular que pasan a la zona dañada. Los neutrófilos son las primeras células reclutadas y se encargan de la absorción de restos celulares y de fagocitar cuerpos apoptóticos. Se produce además, la infiltración de macrófagos y, posteriormente, de linfocitos T y B que se reclutan debido a interacciones célula-célula con los macrófagos (Lee SB 2010). Las células infiltrantes producen a su vez la liberación de citoquinas inflamatorias, pro-fibróticas y apoptóticas, lo que propicia la infiltración de más células inflamatorias circulantes exacerbando la respuesta inflamatoria. Las células residentes también participan en el proceso inflamatorio liberando factores de crecimiento y mediadores que pueden favorecer, bien, la regeneración del tejido y la resolución de la respuesta en condiciones normales, o bien, en condiciones patológicas, dar lugar a una respuesta inflamatoria crónica o una regeneración anormal del tejido (fibrosis) (figura 1) (Saxena R 2008, Sutton TA 2003, Chung AC 2011, Tang SC 2011).

### 2.1.1. EL PROCESO INFLAMATORIO RENAL

Estructuralmente el riñón se compone de dos zonas bien diferenciadas: la región cortical situada en la zona exterior y la zona medular en el interior, ambas estructuras están revestidas por una cápsula fibrosa. La nefrona es la unidad funcional del riñón y está formada por el glomérulo, que contiene células mesangiales, podocitos y una red capilar rodeada de células endoteliales, y el túbulo, formado mayoritariamente por células túbuloepiteliales. La zona localizada entre los túbulos se denomina espacio intersticial.

En el riñón, el proceso inflamatorio se caracteriza por la infiltración glomerular y túbulo-intersticial de células del sistema inmune, incluyendo neutrófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos (Ferenbach D 2007, Blank U 2007). En condiciones patológicas como enfermedades autoinmunes, isquemia, exposición a

toxinas, infección o sobrecarga proteica, las células renales se activan y comienzan a liberar citoquinas (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Tweak), péptidos vasoactivos (Ang II, ET-1) factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , CTGF, PDGF) y especies reactivas de oxígeno que intervienen en la producción quimioquinas (MCP-1,2-3, RANTES, CXCL-16, CXCL-1, MIP-1,2-3) y moléculas de adhesión (ICAM-1). La activación de estas respuestas se produce a través de diferentes vías de señalización, entre las que destacan la vía NF- $\kappa$ B y la vía MAPKs/AP1 (Border WA 1998a 1998b, Segerer S 2000, Guijarro C 2001, Mezzano SA 2001, Ruiz-Ortega M 2002, Wolf G 2004, Rodrigues-Díez R 2008, Sanz AB 2010, Chung AC 2011). La concentración de estas moléculas en el medio favorece la infiltración de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) y la diferenciación y proliferación de miofibroblastos, lo que contribuye a la progresión de la inflamación y, en último término, a la fibrosis (Lee SB 2010, Tang SC 2011).



**FIGURA 1. Respuesta inflamatoria.** Esquema de los mecanismos celulares y moleculares que se producen en respuesta a un daño.

La inflamación renal desempeña un papel importante en el inicio y la progresión de la mayoría de las enfermedades renales crónicas. En la etapa final, el riñón se caracteriza histológicamente por una

inflamación crónica y fibrosis (Saxena R 2007). Además, en plasma de pacientes con ERC los niveles de marcadores de inflamación clásicos como proteína C reactiva, IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF- $\alpha$  se encuentran elevados (Segeer S 2000, Guijarro C 2001, Saxena R 2008). Los pacientes con enfermedad renal terminal (ERT) presentan un deterioro significativo del sistema inmune en comparación con la población general (Girndt M 1999), lo que les hace más propensos a infecciones, presentando un perfil similar al de otros enfermos con inmunidad adquirida o en terapia inmunosupresora (Yoon JW 2006). Estos pacientes presentan además un mayor riesgo de cáncer (Matas AJ 1975). Existen varios factores que se asocian a la inmunidad alterada como la uremia, el metabolismo alterado de la vitamina D, un estado inflamatorio crónico y las terapias de diálisis (hemodiálisis y diálisis peritoneal) (Chung BH 2011). Los procesos inflamatorios, por lo tanto, son un objetivo importante para el desarrollo de fármacos. De hecho muchas de las terapias actuales para el tratamiento de las enfermedades inmunes e inflamatorias se centran principalmente en la reducción de los mediadores proinflamatorios. En modelos experimentales murinos el bloqueo de MCP-1 o RANTES, dos quimioquinas proinflamatorias clásicas, mejora la función renal y reduce el infiltrado celular y la fibrosis mostrando un claro efecto beneficioso (Anders HJ 2010, Vielhauer V 2004, Fujinaka H 1997, Panzer U 1999 y 2006, Wada T 2004, Shimizu H 2003, Kanamori H 2007, Chow FY 2006 y 2007).

## **2.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO FIBRÓTICO**

Las ERCs se caracterizan por una fibrosis progresiva que afecta a todas las subestructuras del riñón, causando fallo renal terminal (Remuzzi G 2006, Hewitson TD 2009, Lee SB 2010). La fibrosis renal consiste en un proceso complejo que implica la infiltración y activación de las células inflamatorias, la activación de las células mesangiales y fibroblastos, la transición mesenquimal de las células tubulares y endoteliales, la apoptosis celular y la acumulación y expansión de la matriz extracelular (Lee SB 2010). La fibrosis es un proceso normal de cicatrización de las heridas que se activa en respuesta al daño para mantener la arquitectura e integridad funcional original del tejido. Sin embargo, la presencia constante de estímulos perjudiciales puede producir la desregulación de los procesos normales y ocasionar un exceso en el depósito de matriz extracelular. Esta acumulación excesiva de la matriz extracelular es debida a un desequilibrio entre los procesos de síntesis, que están aumentados, y los procesos de degradación, que están inhibidos. Entre los diversos factores que contribuyen a la fibrosis TGF- $\beta$  se ha considerado clásicamente como el factor más relevante (Bottinger EP 2007, Wang W 2005b, Eddy AA 2006). También destaca la Ang II como un factor clave en la fibrosis renal, ya que su síntesis está aumentada a nivel local en el daño renal y es capaz de activar a las diferentes células renales (glomerulares, fibroblastos y túbuloepiteliales) aumentando factores de crecimiento y citoquinas que regulan el proceso fibrótico (Ruiz-Ortega M 2006). Diversos estudios sugieren que CTGF podría ser un importante mediador profibrótico ya que actúa como mediador de factores claves en este proceso, como TGF- $\beta$ , ET-1 y Ang II (Grotendorst GR 1997, Ruiz-Ortega M 2002, Rupérez M 2003, Sánchez-López E 2009a y 2009b, Rodríguez-Vita 2005a y 2005b). A pesar del gran número de estudios sobre los mecanismos moleculares implicados en el proceso de



fibrosis renal y el efecto de la modulación terapéutica, no existe un tratamiento antifibrótico eficaz para su empleo en clínica, siendo un campo de investigación muy activo.

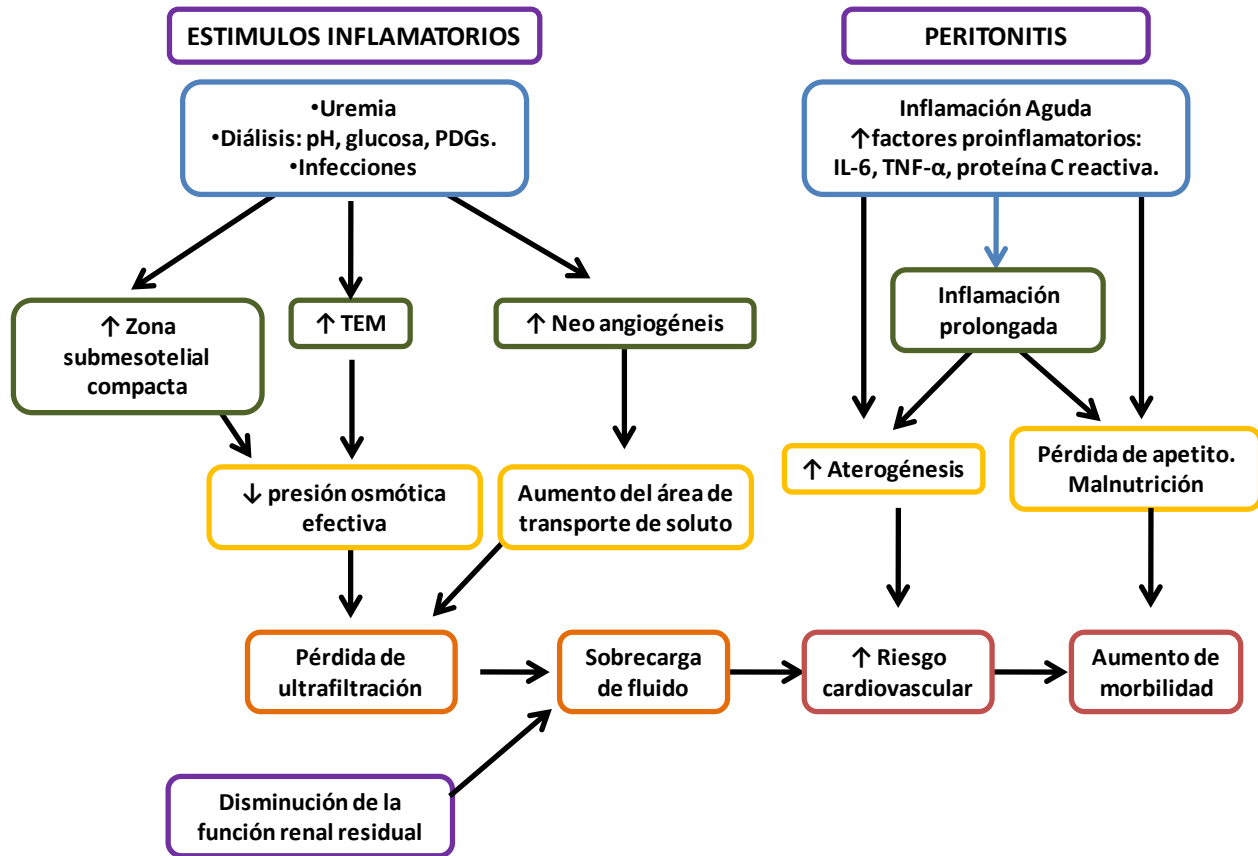
### 3. TERAPIAS EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA: DIÁLISIS PERITONEAL.

La diálisis peritoneal (DP) ambulatoria continuada consiste en la exposición de la membrana peritoneal a un líquido de diálisis hiperosmótico. Este proceso se basa en la diferencia de gradiente osmótico que permite la eliminación de toxinas y solutos dañinos existentes en los vasos peritoneales, sustituyendo así la función de los riñones.

Estructuralmente el peritoneo es una membrana formada por una monocapa de células mesoteliales, que constituyen una membrana basal, denominada mesotelio. Debajo del cual se encuentra la zona submesotelial, formada por una matriz extracelular laxa que contiene tejido adiposo, vasos sanguíneos y linfáticos, fibroblastos, y otras células residentes como mastocitos y, en ocasiones, macrófagos y linfocitos (Di Paolo N 2000). Por su localización el peritoneo se puede dividir en dos capas: la capa exterior, llamada peritoneo parietal que está adherida a la pared abdominal y la capa interior, denominada peritoneo visceral, que envuelve los órganos situados dentro de la cavidad abdominal. El espacio entre ambas capas se denomina cavidad peritoneal.

Durante la DP, las células peritoneales están expuestas de forma reiterada a un ambiente hipertónico no fisiológico debido a la composición de los líquidos de diálisis, que se caracterizan por una elevada concentración de glucosa y sus productos de degradación, productos finales de glicación avanzadas y un pH bajo. Tanto la exposición continuada a estos líquidos, como el proceso de arrastre mecánico y los episodios de peritonitis y hemoperitoneo causan, con el tiempo, una serie de cambios morfológicos en el peritoneo que se asocian con un deterioro funcional. Estos cambios incluyen la pérdida de la superficie mesotelial, la reduplicación y engrosamiento la membrana basal submesotelial y subendotelial lo que da lugar a fibrosis, angiogénesis y vasculopatía hialinizante (Aroeira LS 2007, Selgas R 2009). Estas modificaciones en la estructura del peritoneo están estrechamente relacionadas con una respuesta inflamatoria crónica, tanto local como sistémica (Lai KN 2010).

La inflamación peritoneal causada por la DP es un fenómeno complejo y su repercusión sistémica está todavía poco estudiada. Existe una fuerte asociación entre la peritonitis (frecuencia y la gravedad) y la pérdida de función de la membrana (Davies SJ 1996, Williams JD 2002). También se ha observado que la uremia asociada a ERC induce inflamación en el peritoneo, incluso en pacientes no expuestos a líquido de diálisis (Williams JD 2002) (figura 2). Sin embargo, a pesar de los avances en el tratamiento, la infección peritoneal sigue siendo uno de las principales causas de fracaso de la técnica de DP. De hecho, la inflamación sistémica observada en pacientes en DP es un importante factor de riesgo y de mortalidad cardiovascular (Pecoits-Filho 2002b, Wang AY 2003).



**FIGURA 2.** Esquema de los procesos implicados en el daño causado por la diálisis peritoneal. PDGs: Productos de degradación de glucosa. Modificado de Lai KN 2010.

La diálisis se asocia a una respuesta inmune alterada, un desequilibrio Th1/Th2 y a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Zamauskaite A 1999, Roberts GW 2009, Libetta C 2011). Numerosos estudios han descrito que la DP provoca un aumento de la infiltración de macrófagos y linfocitos en el peritoneo, estas células infiltran la cavidad peritoneal y comienzan a secretar citoquinas y quimioquinas que a su vez atraen más células inflamatorias (Davies SJ 1989, Libetta C 1996, Brauner A 1998, Pecoits-Filho R 2004). Las células residentes (mesoteliales, endoteliales y vasculares) también juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria mediante la secreción de mediadores proinflamatorios que agravan la respuesta (Zemel D 1993 y 1996, Lai KN 2010).

Todos los pacientes en DP desarrollan, con el tiempo, fibrosis peritoneal (Selgas R 2009), en cuya patogenia se han implicado múltiples moléculas, como TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , VEGF, FGF, CTGF e IL-6 (Pecoits-Filho R 2002a, Lai KN 2000 y 2010, Yáñez-Mó M 2003, López-Cabrera M 2006). La fibrosis peritoneal se caracteriza por una acumulación de proteínas de matriz en la zona submesotelial y un engrosamiento de la membrana, se observa además un escaso componente celular. A la progresión de esta fibrosis contribuyen los fibroblastos de la zona submesotelial, que se activan (miofibroblastos) y comienzan a secretar cantidades excesivas de proteínas de matriz extracelular, y las células mesoteliales, que sufren una transición epitelio-mesenquimal y migran hacia el submesotelio; participando activamente en la lesión inicial del proceso de fibrosis peritoneal (Yáñez-Mó M 2003, Margetts PJ 2005). Aunque se sabe que la inflamación de la membrana peritoneal acelera la transdiferenciación de las células mesoteliales de los

pacientes sometidos a la diálisis peritoneal (Aroeira LS 2007), los factores involucrados en la TEM *in vivo* aun no están bien establecidos.

#### 4. LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inflamatoria está mediada tanto por la inmunidad innata y como por la adaptativa. El sistema inmune innato se activa muy temprano en los estados infecciosos o inflamatorios de una manera no-antígeno-específica y se compone de neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* y células T *natural killers*. En cambio, el sistema inmune adaptativo se vuelve sensible a la exposición, a lo largo de varios días, de antígenos específicos (de los agentes patógenos o de sus propias células muertas) e incluye, la maduración de células dendríticas y la presentación de antígenos, la activación, proliferación e interacción de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> [linfocitos T efectores o *helpers*, (Th)] y CD8<sup>+</sup> (linfocitos T citotóxicos) (Zhu J 2008). Los leucocitos, las células dendríticas y los macrófagos juegan un papel importante en ambos tipos de inmunidad mediante la presentación de antígenos a los linfocitos y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Los linfocitos Th tienen un papel central en la regulación de la respuesta inmune adaptativa (Zhu J 2008).

##### 4.1. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS CD4.

En estados normales, la activación de las células Th *naïf* (CD4<sup>+</sup>) es fundamental para el control y la eliminación de patógenos y agentes tóxicos, sin embargo, una activación errónea de estas células, en respuesta a antígenos propios, puede dar lugar a enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, uno de los principales mecanismos utilizados por el sistema inmunológico para prevenir esta respuesta autoinmune es regular con precisión la activación y diferenciación de los linfocitos Th (Zhu J 2008). Ante la presencia de células presentadoras de antígeno, los linfocitos CD4<sup>+</sup> se activan dando lugar a linfocitos Th maduros (figura 3). El descubrimiento de que las células CD4<sup>+</sup> se podían diferenciar a diferentes subtipos de células Th, promoviendo varias vías efectoras de la respuesta inmune, puso de manifiesto la existencia de un complejo mecanismo de regulación (Mosmann TR 1986 y 1989, Cherwinski HM 1997, Gajewski TF 1989, Steinman L 2007).

##### 4.1.1. RESPUESTA TH1 Y TH2.

Los primeros datos sobre la heterogeneidad de las células Th se describieron en 1986 por Robert Coffman y Tim Mosmann los cuales propusieron que las células CD4<sup>+</sup> se podían dividir en dos subtipos dependiendo de los estímulos presentes en el medio, a estos subgrupos los denominaron células Th1 y Th2 (Mosmann TR 1986). Las células Th1 se caracterizan por producir, principalmente, IFN- $\gamma$ , son esenciales para la activación de macrófagos y están implicadas en la eliminación de patógenos intracelulares. Por otro lado, las células Th2 se caracterizan por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 y se encargan de la producción de IgE, el reclutamiento de eosinófilos y participan en la eliminación de

patógenos extracelulares y parásitos. Estudios en pacientes y en modelos experimentales mostraron la participación de las células Th1 en la patogenia de enfermedades autoinmunes y desórdenes inflamatorios, y de las células Th2 en enfermedades atópicas como asma y alergias (Mosmann TR 1986 y 1989, Steinman L 2007). Las citoquinas clave para la diferenciación de estas células en uno u otro subtipo están claramente definidas y son IL-12 e IFN- $\gamma$ , en el caso de las células Th1, e IL-4 para las Th2. Estas citoquinas activan factores de transcripción específicos de las distintas respuestas; T-bet en el caso de la respuesta Th1 (Szabo SJ 2000) y GATA-3 en el de Th2 (Zheng W 1997) (figura 3).

#### 4.1.2. RESPUESTA TH17.

En los últimos años el paradigma Th1/Th2 ha cambiado radicalmente por el descubrimiento de nuevos subtipos, destacando las células Th17 (productoras de IL-17), que difieren no sólo en el perfil de expresión de citoquinas, sino también en las citoquinas y factores de transcripción que llevan a su diferenciación.

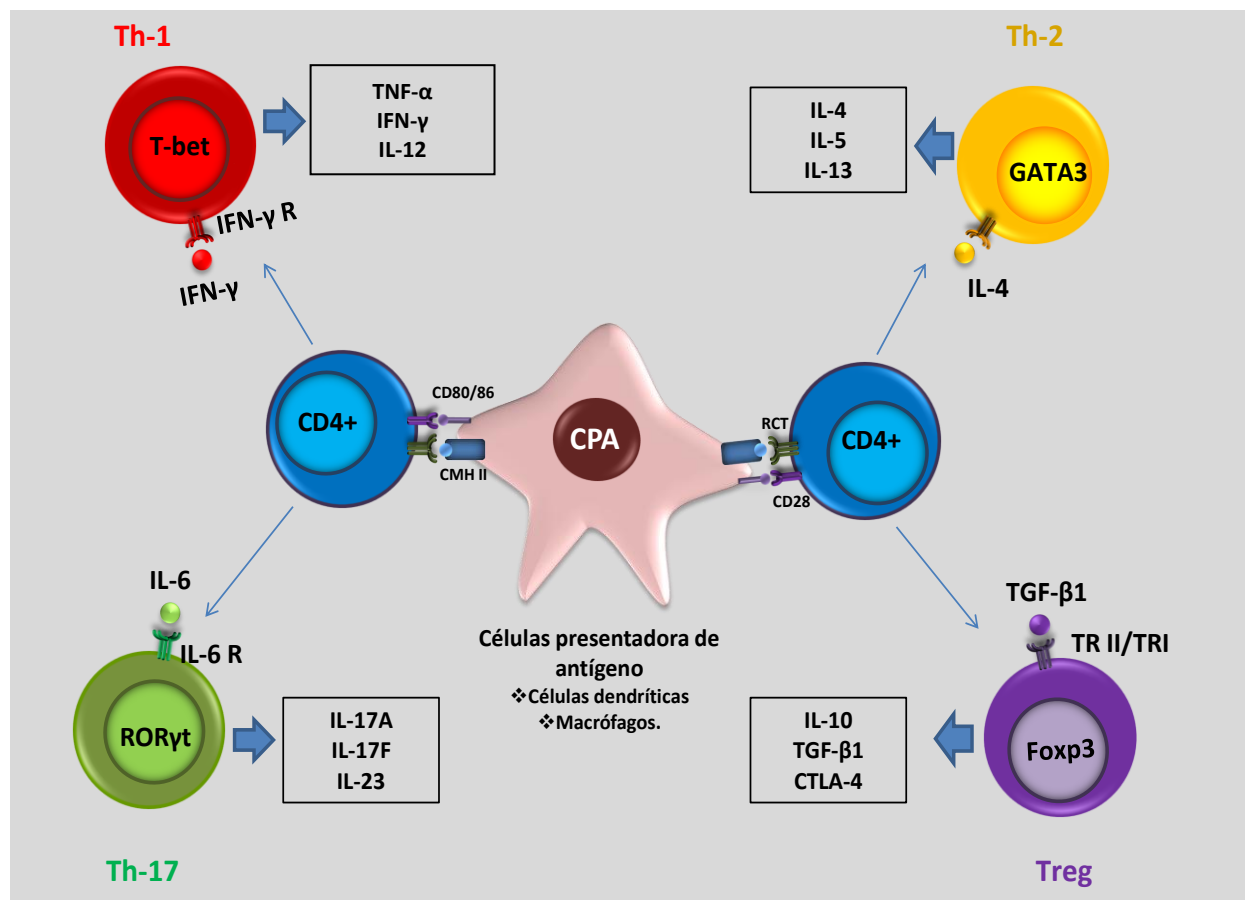
Las células Th17 producen citoquinas de la familia IL-17 (IL-17A-F) siendo IL-17A su principal molécula efectora (Harrington LE 2005). La diferenciación de las células Th17 se produce en presencia de IL-6, la cual induce la expresión ROR $\gamma$ t a través de la activación del transductor de señal y STAT-3 (Ivanov II 2006, Chaudhry A 2009, Egwuagu CE 2009, Mathur AN 2007) (figura 3). De hecho, los pacientes con el síndrome de hiper IgE, asociado a una mutación en el dominio de unión de STAT-3, que les impide señalizar a través de esta vía, presentan deficiencias en la diferenciación de células Th17 (Milner JD 2008, Holland SM 2007, Minegishi Y 2007). Algunos autores han sugerido la participación de TGF- $\beta$ 1 en la activación de esta respuesta, sin embargo existe una cierta controversia (Das J 2009, Bettelli E 2008, Mangan PR 2006, Veldhoen M 2006, Acosta-Rodriguez EV 2007). Un estudio reciente ha mostrado que TGF- $\beta$ 1 induce la respuesta Th17 de forma indirecta, ya que su efecto sería la inhibición los factores de transcripción de las respuestas Th1/Th2 (T-bet y GATA-3, respectivamente), sin afectar a ROR $\gamma$ t (Das J 2009). Las células Th17 también sintetizan IL-21 e IL-23, que señalizan a través de la vía de STAT 3 y son necesarias para el mantenimiento y progresión de esta respuesta (Kastelein RA 2007, Mangan PR 2006, Veldhoen M 2006, Zhu J 2008). En condiciones normales la respuesta Th17 está implicada en la protección del organismo frente a patógenos extracelulares, sin embargo, en condiciones patológicas la respuesta Th17, al igual que la Th1, se asocia con procesos de inflamación crónica (Harrington LE 2005, Korn T 2009, Chen S 2010, Turner JE 2010, Romagnani S 2009). Los avances en el conocimiento de la respuesta Th17 han mostrado que algunas de las enfermedades atribuidas a una respuesta de tipo Th1 estaban, en realidad, mediadas por células Th17. De hecho, años antes del descubrimiento de las células Th17, la implicación de la respuesta Th1 en algunas enfermedades autoinmunes fue puesta en duda. Varios autores observaron en modelos experimentales de encefalomiелitis y de glomerulonefritis autoinmune que los ratones deficientes en IFN- $\gamma$ , citoquina clave en la respuesta Th1, seguían desarrollando la enfermedad e incluso estaba exacerbada; sin embargo, en los ratones deficientes en la subunidad p40 de IL-12 (IL-

12p40), otra de las citoquinas implicadas en la respuesta Th1, los animales estaban protegidos frente al desarrollo de estas enfermedades (Ferber IA 1996, Kitching AR 2004). Esta controversia se resolvió con el descubrimiento de IL-23. IL-23 e IL-12 comparten la subunidad p40, pero se diferencian en que IL-23 posee la subunidad p19 (IL-23p19) e IL-12 la subunidad p35. En modelos experimentales de encefalomiелitis se observó que los ratones deficientes en p19, pero no en p35, estaban protegidos frente al desarrollo de la enfermedad. IL-23 es una citoquina que participa en el mantenimiento de la respuesta Th17 (Kastelein RA 2007) por lo que se concluyó que era IL-23, y no IL-12, es decir, la respuesta Th17 y no la Th1 la que estaba implicada en el desarrollo de esta patología (Cua DJ 2003). Resultados similares se obtuvieron en modelos experimentales de glomerulonefritis (Ooi JD 2009) y de artritis reumatoide (Murphy CA 2003). Estudios posteriores han demostrado que la inhibición de la respuesta Th17, mediante el uso de ratones deficientes en IL-17 o anticuerpos neutralizantes de IL-17A, atenúa el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes y de tipo inflamatorio mostrando la relevancia de esta respuesta a nivel patológico (Paust HJ 2009, Erbel C 2009, Smith E 2010, Madhur MS 2010, Hueber W 2010, Leonardi C 2012, Papp KA 2012). A nivel renal, el grupo de Griffin describió en 2008, la presencia de células Th17 en el modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO), sin embargo estos autores no investigaron la relevancia funcional de estas células en el riñón (Dong X 2008). Posteriormente, en varios modelos experimentales de daño renal se demostró la importancia de la respuesta Th17 mediante la inhibición de alguno de los componentes de la ruta (IL-17 e IL-23), en estos modelos se demostró que la inhibición de la respuesta Th17 mejoraba diversos tipos de glomerulonefritis inmunes experimentales y de nefropatía lúpica (Ooi JD 2009, Paust HJ 2009, Zhang Z 2009, Gan PY 2010). Además de los linfocitos Th17 se han descrito más tipos celulares capaces de producir IL-17A, incluidos linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>, linfocitos  $\gamma\delta$ , células NK, neutrófilos, células vasculares y túbuloepiteliales ((Hamada H 2009, Roark CL 2008, Rachitskaya AV 2008, Michel ML 2007, Miossec P 2009, Gaffen S 2009, Loverre A 2011).

#### 4.1.3. RESPUESTA T REGULADORA (Treg).

Para asegurar que todas las células T periféricas maduras son capaces de reconocer antígenos extraños, sin responder contra sus propios tejidos, las células T sufren un complicado proceso de diferenciación en el timo. Sin embargo, una proporción considerable de células T periféricas es autorreactiva, es decir, reaccionan frente a sus propios antígenos. Esta autorreactividad se genera cuando encuentran autoantígenos en la periferia y se induce anergia o apoptosis, por lo que es necesario un mecanismo de control adicional que implique la supresión de estas células T autorreactivas y potencialmente patogénicas por parte de un subgrupo especializado de células T, las células T reguladoras (Treg) (Weaver CT 2006). La existencia de células T reguladoras o supresoras, es decir, células capaces de suprimir la respuesta antígeno-específica y de transferir esta tolerancia a otros individuos, se conoce desde 1975 (Kilshaw P 1975). En 1995, el grupo de Sakaguchi revisó el concepto de células reguladoras en un modelo murino experimental de enfermedad autoinmune. En ratones timectomizados

a los tres días de nacer, se producía una reacción autoinmune que se revertía mediante la inyección de células  $CD4^+CD25^+$  de un ratón normal (Sakaguchi SJ 1995).



**FIGURA 3.** Esquema de la diferenciación de las células  $CD4^+$ . Durante la activación inicial de los linfocitos  $CD4^+$ , las células presentadoras de antígeno (CPA) secretan una variedad de citoquinas que dirigen a las células T no diferenciadas hacia una vía determinada (Th1, Th2, Th17 o Treg). Modificado de Egwuagu CE 2009

Desde entonces se han descrito diversas poblaciones celulares con actividad reguladora, las más estudiadas son las  $CD4^+CD25^+$  pero también existen linfocitos T  $CD8^+$  (citotóxicos), linfocitos  $\gamma\delta$ , *natural killer*,  $CD3^+CD4^-CD8^-$  o células T *natural killer*, que actúan a través distintos mecanismos y en distintos estadios de la respuesta inmune (Jonuleit H 2003, Jiang H 2004, Shevach EM 2006). Sin embargo, parece estar bien establecido que la expresión del factor de transcripción Foxp3 en estas células es un elemento clave para su caracterización como células Treg (Huehn J 2004, Sakaguchi S 2005, Fontenot JD 2005). Otra característica común a estas células es la síntesis de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Sakaguchi S 2006) (figura 3). Las mutaciones en el gen *foxp3* causan un síndrome autoinmune letal en el ratón *Scurfy* (*foxp3*<sup>-/-</sup>) y son responsables del síndrome humano IPEX (desregulación inmunitaria, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X) donde la presencia de células Treg es escasa y su función defectuosa (Wildin RS 2001, Bennett CL 2001, Brunkow ME 2001). Las células Treg Foxp3<sup>+</sup> se diferencian en dos subtipos, un subtipo denominado Treg naturales (nTreg) que se desarrollan en el timo y necesitan la presencia de IL-12 y la activación de STAT-5 (Yao Z 2007, Josefowicz SZ 2012, Lee HM 2011) y otro denominado Treg inducibles (iTreg) que se desarrollan fuera del timo en presencia de TGF- $\beta$ , con la

activación de la vía Smad3/NFAT. Una vez diferenciados ambos subtipos son indistinguibles (Chen W 2003, Fantini MC 2004, Tone Y 2008).

Es un hecho ampliamente demostrado que todos los subtipos de células T son capaces de regularse entre ellas. Entre las células Treg y Th17 existe una estrecha relación, de forma que la composición de citoquinas del medio extracelular determina la diferenciación hacia uno u otro subtipo, así, en presencia de IL-6 las células CD4<sup>+</sup> se diferencian en su mayoría a células Th17, mientras que en ausencia de IL-6 y presencia de TGF- $\beta$  se diferencian a Treg (Bettelli E 2006, Mangan PR 2006, Mucida D 2007, Xu L 2007, Yang XO 2008, Zhou L 2008, Weaver CT 2009). También existe una interacción física entre Foxp3 y ROR $\gamma$ t que inhibe las funciones de este último (Zhou L 2008). Además, se ha observado que STAT-5, un inductor de células Treg, compite por el sitio de unión de STAT-3 en el promotor de IL-17A reprimiendo su activación (Yang XP 2011). Una evidencia de esta estrecha relación es la existencia de una pequeña población de células IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> observada en ratones (Zhou L 2008) y en humanos (Ayyoub M 2009, Beriou G 2009, Voo K S 2009, Kryczek I 2011).

## 5. INTERLEUQUINA 17A (IL-17A): CITOQUINA EFECTORA DE LA RESPUESTA TH17.

### 5.1. FAMILIA IL-17

La familia IL-17 forma junto con sus receptores (IL-17Rs) una subfamilia de citoquinas/receptores, con características estructurales únicas. La familia se compone de 6 citoquinas (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (o IL-25) e IL-17F), que presentan un dominio conservado de cisteínas y una homología entre el 20-50%, y sus receptores (IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL-17RD e IL17RE) (Gaffen S 2009) (Tabla 1).

Interleuquina	Receptores	Función principal	Expresión
IL-17A	IL-17RA IL-17RC	Patología autoinmune. Reclutamiento de neutrófilos. Inmunidad a patógenos extracelulares	Th17, células CD8, linfocitos T $\gamma\delta^+$ , NK, NKT, LTi
IL-17B	IL-17RB	Actividad pro-inflamatoria	Tracto gastrointestinal, Páncreas, neuronas
IL-17C	IL-17RE	Actividad pro-inflamatoria	Próstata, riñón fetal
IL-17D		Actividad pro-inflamatoria	Músculo, cerebro, corazón, pulmón, páncreas, tejido adiposo
IL-17E ó IL-25	IL-17RB IL-17RA	Induce respuesta Th2. Suprime respuesta Th17	Linfocitos intraepiteliales, pulmón, células epiteliales, macrófagos alveolares, eosinófilos, basófilos, células T NK, células Th2, mastocitos, tracto gastrointestinal, útero
IL-17F	IL-17RA IL-17RC	Patología autoinmune (presumiblemente). Reclutamiento de neutrófilos. Inmunidad a patógenos extracelulares	Th17, células CD8, linfocitos T $\gamma\delta^+$ , NK, NKT, LTi

**TABLA 1.** Citoquinas y receptores de la familia IL-17. Posibles funciones y células o tejidos en los que se expresan. Modificado de Gaffen S 2009.

IL-17A, también conocida como proteína asociada a linfocito T citotóxico 8 (CTLA-8) o IL-17, es la citoquina clave en la respuesta Th17 y desempeña un papel importante en la protección del huésped



contra patógenos extracelulares, sin embargo, también promueve el desarrollo de una respuesta inflamatoria en enfermedades autoinmunes (Pappu R 2010). Es una glicoproteína de 155 amino ácidos con un peso molecular de 15kDa que se secreta en forma de homodímero de 35kDa y fue aislada por primera vez en 1996 por el grupo de Serge Lebecque (Fossiez F 1996). Sin embargo, no adquirió importancia hasta hace pocos años al demostrarse su papel en enfermedades inflamatorias crónicas (Miossec P 2009).

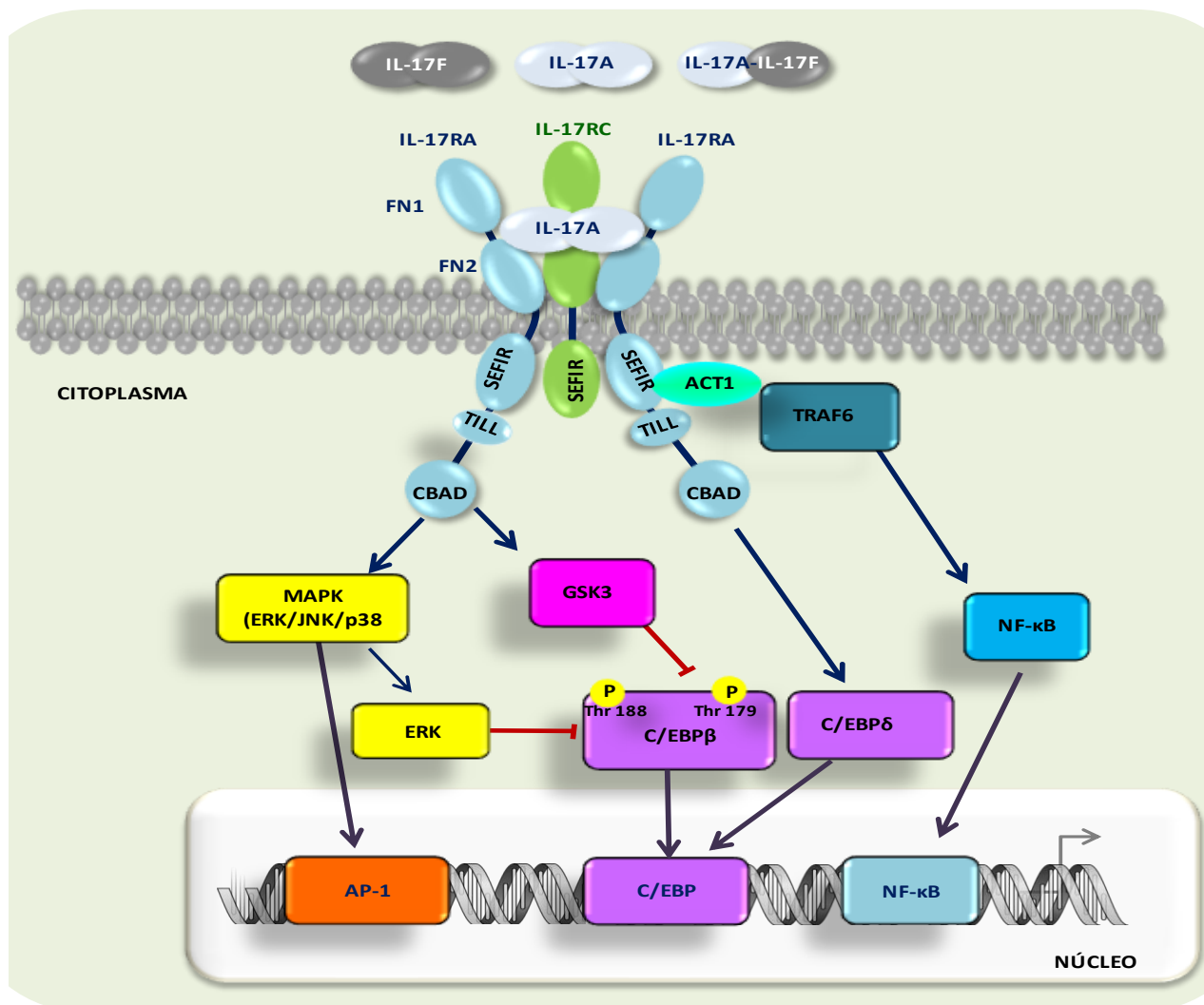
Otra de las citoquinas mejor caracterizada de la familia es IL-17F. Ambas citoquinas poseen una homología del 50%, se secretan en forma de homodímero, señalizan a través del mismo receptor IL-17R y son capaces de dimerizar entre ellas formando complejos IL-17A-IL-17F (Wright JF 2007) (figura 4). Sin embargo, tienen distintos efectos biológicos. IL-17A induce una señalización más potente, de un orden de magnitud 10-30 veces mayor que la inducida por IL-17F. Estudios *in vitro*, en células mononucleares de sangre periférica, indican que los heterodímeros tendrían un magnitud de señalización intermedia (Wright JF 2007, Gaffen S 2009). La señalización de IL-17A a través de su receptor induce la producción de citoquinas (IL-6, IL-1, IL-8 y TNF- $\alpha$ ), quimioquinas (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , Gro- $\alpha$ , CXCL10, MCP-3, CCL20) y metaloproteasas (MMP-3 y MMP-13) (Park H 2005). Mediante la inducción de estas citoquinas, IL-17A activa un mecanismo de retroalimentación positivo que induce la transformación de células CD4<sup>+</sup> *naïf* en células Th17 y favorece el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos (Ouyang W 2008, Miossec P 2009). Aunque con menos afinidad, IL-17F también es capaz de inducir, citoquinas (IL-6, G-CSF, y GM-CSF), quimioquinas (Gro- $\alpha$ , MIP-2 $\alpha$  y CXCL5) y de incrementar el reclutamiento de neutrófilos (Kawaguchi M 2004, Kolls JK 2004).

## **5.2. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE IL-17A.**

El receptor IL-17R es un complejo compuesto por IL-17RA e IL-17RC. Ambas subunidades poseen un dominio SEFIR, la subunidad IL-RA posee además otros dos dominios, denominados TILL y CBAD. A través de dominio SEFIR, IL-17A se une al adaptador ACT1 para activar varias vías de señalización (Chang SH 2006, Qian Y 2007, Linden A 2007). Mediante el reclutamiento de TRAF6, ACT-1 es capaz de activar al factor de transcripción C/EBP $\delta$ , y la vía clásica de señalización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, un elemento clave en inflamación (Yao Z 1995, Ruddy MJ 2004). Por otro lado, IL-17RA inhibe a C/EBP $\beta$  mediante dos fosforilaciones consecutivas, una en la tirosina 188 mediada por el dominio SEFIR/TILL, a través de la ERK, y otra en la tirosina 179 mediada por el dominio CBAD, a través de GSK3 $\beta$  (Shen F 2009) (figura 4).

Otra de las vías típicas de señalización de mediadores proinflamatorios es la activación del factor de transcripción AP-1, a través de la vía de las MAPKs. En distintos tipos celulares se ha descrito la activación de los tres subgrupos de MAPKs (ERK1/2, JNK y p38) en presencia de IL-17A siendo la activación de ERK1/2 la predominante (Laan M 2001). La activación de esta vía parece jugar un papel más importante en control de la estabilidad de los transcritos activados por IL-17A que en la activación génica en sí misma (Wright JF 2008).





**FIGURA 4:** Estructura y vías de señalización de IL-17A e IL-17F a través del receptor IL-17RA. Modificado de Gaffen S 2009

Tanto los homodímeros como los heterodímeros de IL-17A e IL-17F son capaces de señalizar a través de este receptor. Sin embargo, los estudios de resonancia de superficie indican que la afinidad de unión de los dímeros por la subunidad IL-17RC es muy parecida, mientras que su afinidad por IL-17RA es distinta; siendo mayor la de IL-17A y menor la de IL-17F y quedando la del heterodímero en un punto intermedio, lo que explicaría los distintos grados de respuesta producidos por las distintas subunidades (Gaffen 2009). Además, la forma soluble de los receptores es capaz de inhibir la actividad de las citoquinas, de forma que IL-17RAs inhibe la actividad de IL-17A, IL-17RCs inhibe la de IL-17F y una combinación de receptores solubles IL17-RA/IL-17RC inhibe la actividad del heterodímero IL-17A-IL-17F (Wright JF 2008).

### 5.3. IL-17A EN LA PATOLOGÍA RENAL.

Las primeras evidencias de la contribución de IL-17A a la respuesta inflamatoria en el riñón se describieron en 1998 (Van Kooten C 1998) (cuando aún no se habían descubierto las células Th17). Experimentos *in vitro* demostraron que la estimulación de células túbuloepiteliales humanas con IL-17A

inducía la producción de factores pro-inflamatorios como IL-6, IL-8 o MCP-1 contribuyendo a la creación de un ambiente inflamatorio (Van Kooten C 1998, Loong CC 2002). Estudios *in vivo* y datos en pacientes evidenciaron la relación entre niveles elevados de IL-17A y un mayor rechazo del injerto en trasplante renal (Loong CC 2002). En modelos experimentales autoinmunes, incluidos modelos de glomerulonefritis anti-mieloperoxidasa, glomerulonefritis anti-membrana basal y nefritis lúpica (Ooi JD 2009, Paust HJ 2009, Zhang Z 2009, Gan PY 2010), y en el modelos no inmunes como el de obstrucción unilateral del uréter o el de isquemia reperfundición; se han observado niveles elevados de IL-17A asociados a respuesta inflamatoria (Dong X 2008, Li L 2010). En pacientes con nefritis lúpica se ha descrito la presencia de IL-17A en el glomérulo (Crispin JC 2008), los pacientes con vasculitis y glomerulonefritis asociada a ANCA presentan niveles elevados de IL-17A tanto en suero como en riñón (Nogueira E 2010, Velden J 2012).

En el riñón IL-17A, a través de los receptores IL-17RA, estimula a las células residentes (células túbuloepiteliales y mesangiales) activando la producción citoquinas proinflamatorias (IL-6) y moléculas quimioattractantes de macrófagos, neutrófilos y células T; lo que contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias en el túbulointersticio y en el glomérulo (Paust HJ 2009, Iyoda M 2009) (Figura 5).

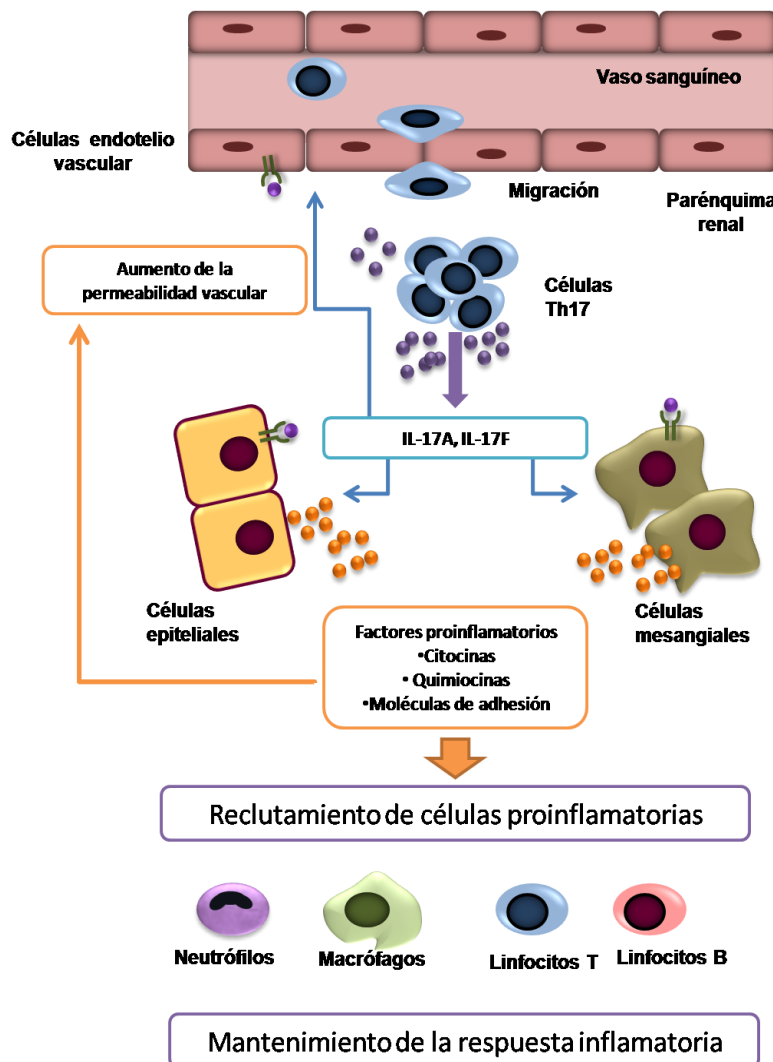


FIGURA 5. Efecto de la estimulación de IL-17A e IL-17F en las células renales. Modificado de Turner E 2010.

#### **5.4. IL-17A EN LA PATOLOGÍA CARDIO-VASCULAR.**

El papel de las respuestas Th1/Th2 en aterogénesis está bien establecido, siendo la respuesta Th1 pro-aterogénica, mientras que la Th2 es anti-aterogénica (Daugherty A 2002). En los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio del papel de las células Th17 en daño cardiovascular. Recientemente se ha descrito la presencia de células Th17 en placas ateroscleróticas de arterias coronarias (Butcher MJ 2012) y se han encontrado niveles elevados de IL-17A en plasma de pacientes con infarto agudo de miocardio, angina inestable e insuficiencia cardíaca (Hashmi S 2006, Briceño LG 2009, Eid RE 2009). El bloqueo de IL-17A, mediante anticuerpos neutralizantes o utilizando un sistema adenoviral de la forma soluble de IL-17RA, ha mostrado efectos beneficiosos en el modelo aterosclerótico en ratones ApoE<sup>-/-</sup>, al reducir el tamaño de la lesión (Erbel C 2009, Smith E 2010) y en el modelo de daño vascular mediado por Ang II, donde mejora la disfunción vascular (Madhur MS 2010). En células de músculo liso vascular la estimulación con IL-17A induce la activación de mediadores proinflamatorios como, IL-6, IL-8, CXCL10, y proteína C reactiva y de especies reactivas de oxígeno a través de una serie de mecanismos que implican la activación de varias vías de señalización, incluidas MAPKs (p-38 y ERK) y factores de transcripción (NF- $\kappa$ B y C/EBP  $\beta$ ). En células endoteliales IL-17A es capaz de inducir la actividad de iNOS y la producción de óxido nítrico (Pietrowski E 2011).

#### **5.5. IL-17A Y DIÁLISIS PERITONEAL.**

Los tratamientos de DP prolongados están asociados con cambios en el perfil de citoquinas de una respuesta Th1 hacia una Th2 (Zamauskaite A 1999). En células mesoteliales humanas IL-17A activa al factor de estimulación de colonia de granulocitos (G-CSF) mediante un mecanismo dependiente de NF- $\kappa$ B (Witowski J 2007). En ratones la inyección intraperitoneal de IL-17A induce acumulación de leucocitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, en el peritoneo mediante un mecanismo dependiente de G-CSF y un aumento de la quimioquina KC (homólogo murino del oncogen relacionado con el crecimiento  $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ) (Witowski J 2000 y 2007). También se ha descrito la participación de IL-17A en la formación de abscesos en la sepsis intra-abdominal (Chung DR 2003). Además, en pacientes urémicos en hemodiálisis se ha descrito un aumento en los niveles de IL-17A circulante, especialmente en pacientes que han sufrido eventos cardiovasculares (Zhang J 2010). Sin embargo, no existen estudios que determinen la contribución de IL-17A a la progresión del daño por diálisis peritoneal.

### **6. FACTORES CLAVES IMPLICADOS EN EL DAÑO RENAL.**

#### **6.1. FACTOR DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CONECTIVO (CTGF).**

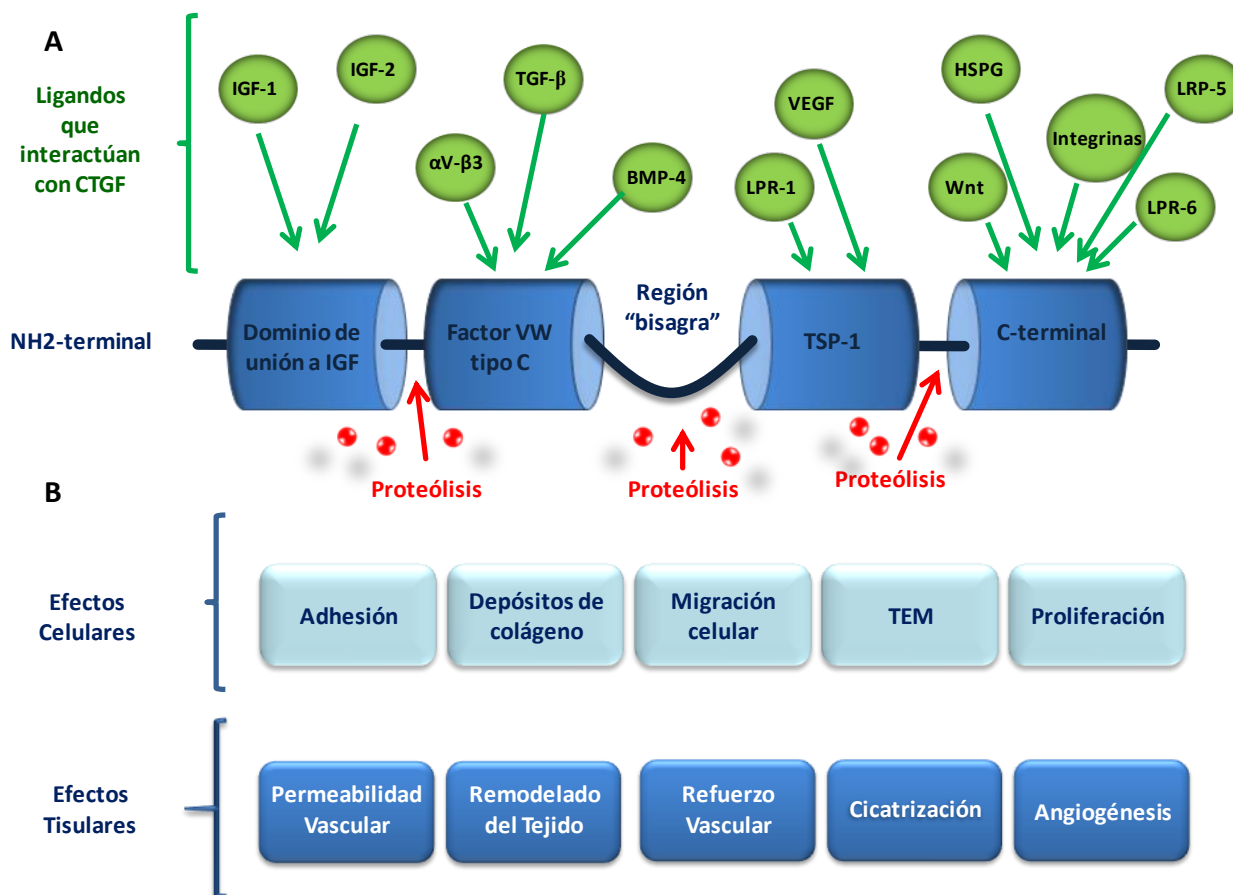
##### **6.1.1. FAMILIA CCN.**

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) o CCN2, es una proteína matricelular modular de 38 kDa que pertenece a la familia CCN de proteínas secretadas ricas en cisteínas. Las proteínas

matricelulares actúan como moduladores de la función celular y suelen encontrarse expresadas en altos niveles durante las etapas del desarrollo, desapareciendo en la etapa adulta (Leask A 2006). Formadas por varios dominios que poseen distintas funciones, estas proteínas pueden unirse a múltiples receptores y su actividad está modulada por diversos factores de crecimiento y proteasas (figura 6). La familia CCN recibe su nombre de tres de sus miembros prototípicos: la proteína rica en cisteína 61 (**C**yr61 ó CCN1), el factor de crecimiento de tejido conectivo (**C**TGF ó CCN2) y la proteína sobreexpresada en nefroblastoma (**N**OV ó CCN3). Esta familia está formada por 6 proteínas secretadas agrupadas en base a la semejanza de su estructura secundaria, que incluyen, además de las anteriormente mencionadas, las proteínas secretadas inducidas por Wnt-1 (WISP) 1 (WISP-1 ó CCN4), 2 (WISP-2/CCN5) y 3 (WISP-3/CCN6) (Kular L 2011). La estructura característica común de esta familia de proteínas consiste en módulos separados que comparten cierta identidad con los dominios funcionales de otras moléculas reguladoras. Un prototipo de las proteínas CCN contiene (salvo excepciones): un péptido señal de secreción N-terminal y cuatro áreas funcionales: 1) módulo de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP), 2) módulo de repetición del Factor Von Willebrand (VW) tipo C, 3) módulo de repetición tipo trombospondina-1 (TSP-1) y 4) un dominio C terminal que contiene un nudo de cisteína (figura 6). Aparentemente las regiones que existen entre todos los módulos son susceptibles de ser separadas mediante proteólisis (Perbal B. 2005), lo que daría lugar a moléculas individuales con actividad biológica que podrían actuar como reguladores en distintos procesos (Brigstock DR 1999). La presencia de estas proteínas “truncadas” se ha asociado con etapas específicas del desarrollo y situaciones patológicas (Perbal B 2001a). La existencia de estas secuencias proteolizables constituiría, por tanto, un tipo de regulación adicional de la actividad de estas proteínas (Perbal B 2001b y 2004).

### 6.1.2. CTGF

El CTGF humano fue aislado por primera vez en 1991 como una proteína secretada por células del endotelio vascular cultivadas en un medio condicionado con PDGF (Bradham DM 1991). La secreción de CTGF al espacio extracelular depende de la señal N-terminal. Al igual que el resto de las proteínas de la familia, CTGF, tiene una estructura modular compuesta por cuatro dominios (figura 6). Entre los dominios 2 y 3 existe una región bisagra que es susceptible de ser degradada por proteasas, dando lugar a un fragmento N-terminal y un fragmento C- terminal que pueden encontrarse en los fluidos biológicos junto con la molécula completa. Todas estas variaciones en la molécula dan lugar a distintas funciones biológicas (Perbal B 2004, De Winter P 2008). CTGF es capaz de interactuar con diversas moléculas, a través de sus diferentes dominios puede unirse a integrinas, receptores heparan sulfato, moléculas de la superfamilia de TGF- $\beta$ , como el propio TGF- $\beta$  o BMPs; trombospondina, factores de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) y a fibronectina (Kim HS 1997, Jedsadayanmata A 1999, Hoshijima M 2000, Abreu JG 2006) (figura 6).



**FIGURA 6.** Estructura (A) y acciones (B) de CTGF como molécula prototipo de la familia CCN. Modificado de Dendooven A 2011.

Clásicamente, CTGF ha sido considerado como un factor profibrótico, sin embargo los estudios realizados en los últimos años han expandido esta idea y ha pasado a considerarse CTGF como un factor multifuncional, con distintas actividades como angiogénesis, migración, adhesión y regulación de proliferación/apoptosis celular. En estados embrionarios la expresión de CTGF se encuentra elevada (Lau LF 1999) y participa en procesos de angiogénesis y en desarrollo esquelético. De hecho, los ratones deficientes en el gen de CTGF sufren letalidad perinatal debido a graves anomalías en el desarrollo esquelético y defectos en angiogénesis (Ivkovic S 2003). A bajos niveles, CTGF favorece la cicatrización de heridas contribuyendo a la formación de tejido conectivo después de un daño. En la mayoría de patologías humanas caracterizadas por un proceso inflamatorio-fibroproliferativo, incluidos desordenes de la piel, enfermedades cardíacas, hipertensión y fibrosis pulmonar, cirrosis y enfermedades renales crónicas; CTGF se encuentra sobreexpresado y localizado principalmente en las áreas fibróticas (Ito Y 1998, Lau LF 1999, Blom IE 2002, Gupta S 2000, Yokoi H 2002, Perbal B 2004, Phanish MK 2010).

En 1997, se demostró el papel profibrótico de CTGF como mediador de los efectos de TGF- $\beta$  (Grotendorst GR 1997). Estudios posteriores demostraron que otros estímulos profibróticos como Ang II, ET-1, altas concentraciones de glucosa, productos de glicación avanzados, trombina o estrés oxidativo

eran capaces de inducir la expresión de CTGF (Rupérez M 2003, Burns WC 2006, Leask A 2006, Rodríguez-Vita J 2005a y 2005b, Sanchez López E 2009).

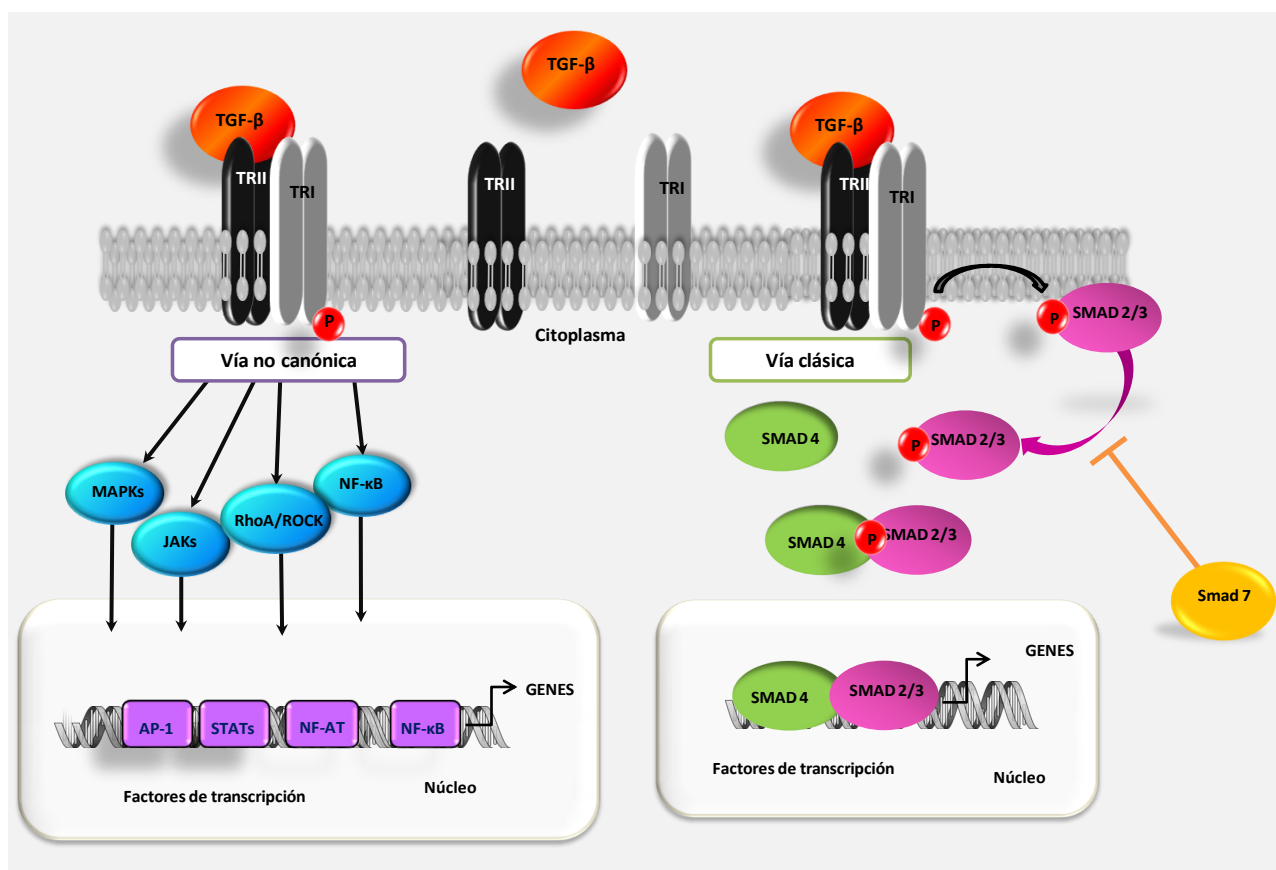
Aunque uno de los paradigmas de CTGF es su papel como mediador de factores profibrótico, se sabe muy poco sobre el efecto de CTGF *per se*. En estudios realizados por nuestro grupo en el modelo de infusión de Ang II, se observó una activación rápida de CTGF (3 días) que precede a la aparición de factores profibróticos, como TGF- $\beta$  y proteínas de MEC, y que coincide con la aparición de una respuesta inflamatoria, caracterizada por la presencia de células inflamatorias en el glomérulo y en el túbulo-intersticio. Estos datos sugieren que CTGF, además de estar implicado en la fibrosis inducida por Ang II podría ser un mediador de sus efectos inflamatorios en situaciones de daño renal (Ruiz-Ortega M 2002, Rupérez M 2003). Muchos estudios *in vitro*, sugieren la participación de CTGF en la regulación de la respuesta inflamatoria. En cardiomiocitos CTGF induce la expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 y MCP-1 (Wang X 2010). Además, en células mesangiales CTGF induce la expresión de MCP-1, RANTES, fractalquina y CXCL16 y en células tubulares de MCP-1 y RANTES; a través de vías de señalización de MAPK/NF- $\kappa$ B (Wu SH 2008, Sanchez-López E 2009). En células estrelladas pancreáticas, CTGF induce expresión de IL-6 e IL-1 $\beta$  a través de la vía NF- $\kappa$ B (Karger A 2008). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que la administración de CTGF recombinante en ratones es capaz de inducir a las 24 horas una respuesta inflamatoria en el riñón, caracterizada por reclutamiento de células inflamatorias en el intersticio, producción de citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-6 y IL-4), y quimioquinas (MCP-1 y RANTES); mediante la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Sánchez-López E 2009a). Todos estos datos indican una posible implicación de CTGF en la respuesta inflamatoria más allá de su efecto como mediador de citoquinas profibróticas.

## **6.2. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

La superfamilia del TGF- $\beta$  se compone de 40 citoquinas estructuralmente relacionadas entre las que se encuentran TGF- $\beta$  1,2 y 3, BMPs, activinas, inhibinas, factores de crecimiento y el factor inhibitorio Mülleriano (MIF) (Santibañez JF 2011). Todas ellas participan en una amplia gama de procesos biológicos, desde la especificación del eje durante la diferenciación tisular en etapas de desarrollo temprano, hasta la regulación de diversas funciones inmunológicas en el organismo adulto (Grainger DJ 2004). Los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  se producen generalmente en forma de precursores latentes dimericos que, posteriormente, se activan en el medio extracelular, liberando los ligandos de unión al receptor los cuales comparten un motivo estructural común denominado nudo cisteína.

TGF- $\beta$  regula una gran cantidad de procesos biológicos tales como morfogénesis, desarrollo embrionario, cicatrización de heridas e inflamación, de hecho los ratones deficientes en TGF- $\beta$  sufren una letalidad post-embrionaria, a las 3-4 semanas de edad, debido a una inflamación multiorgánica (Kulkarni AB 1993). Las alteraciones en TGF- $\beta$  y en componentes de su vía de señalización pueden contribuir a una amplia gama de enfermedades incluidas patologías cardiovasculares, fibrosis, cáncer y

enfermedades congénitas (Santibañez JF 2011). TGF- $\beta$ 1 se secreta como un complejo latente formado por: el dímero TGF- $\beta$ 1 maduro, un péptido de latencia asociado (LAP), que se une a la zona amino terminal e impide la unión de TGF- $\beta$ 1 a sus receptores, y una proteína de unión a la forma latente (LTBP), que evita la interacción con proteínas de matriz (Oklu R 2000). La activación de TGF- $\beta$ 1 se produce por su separación de LAP y puede estar mediada por variaciones de pH, calor, proteasas, TSP-1, especies reactivas de oxígeno o la integrina  $\alpha$ V $\beta$ 6 (Khalil N 1999, Ribeiro SM 1999). La forma activa de TGF- $\beta$ 1 se une al receptores de tipo serina/treonina quinasa II (TRII) que, seguidamente, interacciona y fosforila al receptor I (TRI) produciéndose un complejo ligando-receptor activado (Kang JS 2009) capaz de activar por fosforilación a proteínas Smad reguladas por receptor (R-Smad 2/3). Una vez fosforiladas, estas proteínas forman un complejo heterotrimérico con Smad4 que se transloca al núcleo actuando como un regulador transcripcional (figura 7). La inhibición de esta vía de señalización se produce por Smad7, que se une TRI activo e impide la fosforilación de las R-Smad (Kavak P 2000). A parte de a sus receptores, TGF- $\beta$  también puede interaccionar con otros co-receptores, como endoglina y betaglicanos (receptores TRIIIs) (Shi Y 2003, Bernabeu C 2009). TGF- $\beta$  puede activar otras vías intracelulares como la ruta de MAPKs, NF- $\kappa$ B, RhoA/ROCK, PI3K/Akt o HIF-1 (Moustakas A 2009, Sanchez-Elsner T 2001, Zhang YE 2009).



**FIGURA 7.** Vías de señalización de TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$  se encuentra ampliamente expresado en casi todas las células del riñón y se le considera un mediador clave de la fibrosis glomerular y túbulointersticial, ya que la sobreexpresión en modelos experimentales de TGF- $\beta$  o de sus receptores provoca fibrosis renal (Gagliardini E 2006). TGF- $\beta$  es capaz

de estimular la producción de proteínas de MEC y de inhibir metaloproteasas y colagenasas favoreciendo la acumulación de MEC. Además, se le considera un mediador clave en la inducción de TEM (Hills CE 2011). Sin embargo, TGF- $\beta$  también está considerado como un mediador antiinflamatorio ya que los ratones que sobreexpresan TGF- $\beta$ , o en alguno de los componentes de su vía de señalización, presentan mayor protección frente a la inflamación en diversos modelos experimentales inflamatorios (Chen W 1998, Piccirillo CA 1998, JinYX 2000, Raz E 1995).





## ***II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



## HIPÓTESIS

Independientemente de la etiología subyacente, la progresión de la enfermedad renal se caracteriza por un proceso inflamatorio inicial, seguido de fibrosis túbulo-intersticial, que conduce al fallo renal terminal. Nuestra hipótesis es que la respuesta Th17 está activada en la enfermedad renal crónica, independiente de su etiopatogenia, y que su citoquina efectora, IL-17A, juega un papel activo en la progresión del daño renal.

La mayor causa de muerte de los pacientes con enfermedad renal crónica, incluidos los sometidos a diálisis peritoneal, son los accidentes cardiovasculares. Esta conexión cardio-renal sugiere la existencia de mediadores y mecanismos comunes implicados en la progresión del daño tisular. Nuestra hipótesis es que el CTGF, como mediador, y la respuesta Th17, como mecanismo de acción, son claves en la progresión del daño en ambos tejidos renal y cardiovascular.

Una de las complicaciones de la diálisis peritoneal es la pérdida de funcionalidad de la membrana peritoneal debido a la exposición reiterada a líquidos de diálisis. Nuestra hipótesis es que la activación de la respuesta Th17 local por el daño crónico al que está sometida la membrana peritoneal podría contribuir a la inflamación en el peritoneo.

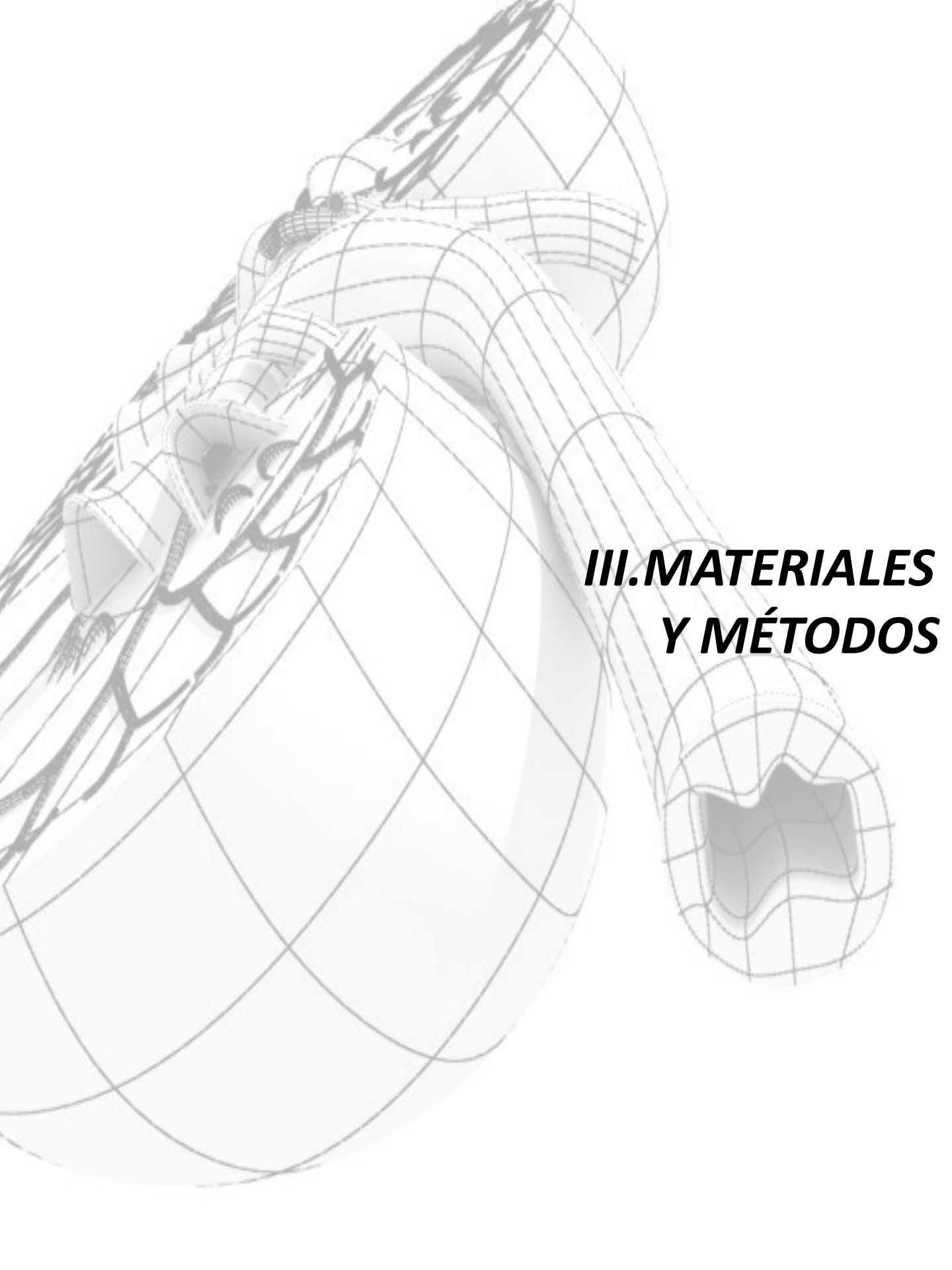
## OBJETIVOS

**Objetivo general:** Estudiar si la respuesta Th17 está implicada en la progresión de la enfermedad renal crónica y en sus complicaciones asociadas, evaluando la contribución de su citoquina efectora IL-17A.

### Objetivos concretos:

1. Estudiar si la respuesta Th17 está activada en modelos experimentales de daño renal y en patologías renales humanas no inmunes. Determinar el efecto del bloqueo de IL-17A en la progresión del daño renal experimental.
2. Evaluar el papel de la Th17 en el daño vascular en el modelo murino de administración sistémica de CTGF, como aproximación experimental a la búsqueda de mediadores y mecanismos comunes en la conexión del daño cardio-renal.
3. Estudiar si la respuesta Th17 está implicada en el daño de la membrana peritoneal causado por la exposición crónica a los líquidos utilizados en la diálisis peritoneal, tanto en pacientes como estudios experimentales.





# ***III.MATERIALES Y MÉTODOS***



## 1. MODELOS EXPERIMENTALES.

Todos los procedimientos con los animales se realizaron de acuerdo a la normativa Internacional vigente (Real Decreto 1201/2005, BOE núm. 268 LEY 32/2007) y fueron aprobados por el comité ético de la institución en la que se realizaron (Instituto de Investigación Fundación Jiménez Díaz y Instituto IDIPAZ).

Para los modelos murinos se utilizaron ratones de la cepa C57BL6 (obtenidos de Charles River, Barcelona, España). Después de la recepción de los animales, estos se mantuvieron en jaulas ventiladas para minimizar el riesgo de infección por patógenos. En la mayoría de los modelos se emplearon ratones machos para evitar la posible interacción debido a las fluctuaciones hormonales de las hembras. En el caso de los modelos de daño peritoneal por líquido de diálisis se emplearon hembras ya que la mayor agresividad de los machos hace que se retiren el catéter disminuyendo así el número de ratones disponibles al final del estudio. Todos los ratones empleados tenían 8-10 semanas de edad, un peso aproximado de 25 gr. Durante el procedimiento experimental los ratones se pesaron cada semana y los que presentan más del 10% de pérdida de peso, cualquier signo de infección, o una actividad anormal fueron excluidos del experimento. En los modelos realizados en rata se emplearon machos de la cepa Wistar Kyoto de 6-10 semanas de edad con un peso aproximado de 150gr y ratas espontáneamente hipertensas, cepa SHR, de 6 semanas.

En los modelos de daño renal, el día del sacrificio se recogió sangre de cada animal para su posterior valoración. Tras el sacrificio, los ratones fueron perfundidos con salino frío por vía cardiaca y se recogieron los riñones y, en los casos que se indica, la aorta. Una sección tanto del riñón como de la aorta se fijó en solución salina de formaldehído 4% y posteriormente se incluyó en parafina para el análisis inmunohistoquímico. Otra sección del riñón se incluyó en medio de crio-preservación (OCT: Tissue-Tek), para estudios de inmunofluorescencia. Por último el resto del riñón y de la aorta se congelaron en nitrógeno líquido para el estudio de genes y proteínas.

En los estudios de daño peritoneal, el peritoneo fue cuidadosamente examinado para detectar cualquier signo de sangrado o infección. Una parte del peritoneo fue congelado en nitrógeno líquido para el análisis de proteínas y genes, otra sección se fijo en líquido de Bouin y posteriormente se incluyó en parafina para el estudio morfométrico e inmunohistoquímico, para estudios de inmunofluorescencia una sección de peritoneo se embebió en medio de criopreservación (OCT).

### 1.1. MODELO EXPERIMENTAL DE INFUSIÓN SISTÉMICA DE CTGF EN RATÓN.

A los ratones se les administró, por vía intraperitoneal, una única dosis de CTGF recombinante (Fragmento C-terminal: MBL) de 2,5 ng por gr de peso de ratón, disuelto en salino. La dosis de CTGF empleada fue igual a la utilizada en otros estudios de nuestro grupo (Sanchez-Lopez E 2009a) y equivalente a la empleada en estudios *in vitro*. Los ratones fueron sacrificados 5, 10 y 15 días después de la inyección de CTGF (figura 8). Como controles utilizamos ratones machos, de edad similar, a los que

se les inyectó un volumen de salino igual al de los ratones tratados. El número inicial de ratones estudiados fue de 5 ratones por grupo, posteriormente este número se amplió en el grupo control y en el tratado con CTGF durante 10 días, que era en el que observamos una mayor respuesta inflamatoria, hasta alcanzar un total de 10 ratones por grupo.

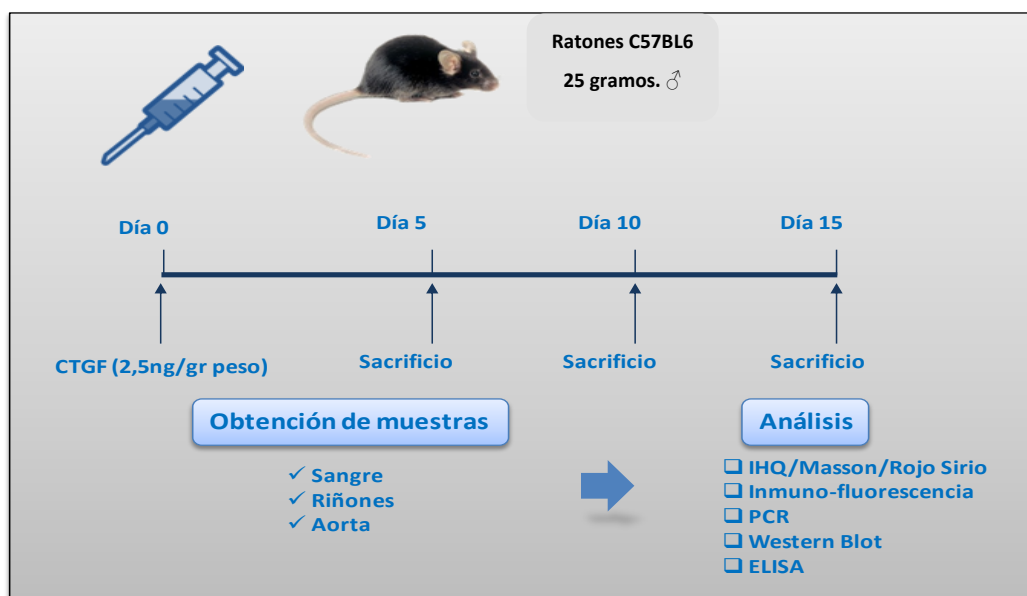


FIGURA 8: Esquema del modelo experimental de administración sistémica de CTGF en ratón.

### 1.1.1. NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A Y TGF- $\beta$ EN RATONES INYECTADOS CON CTGF.

Para evaluar los efectos de IL-17A y TGF- $\beta$  en el modelo de CTGF, bloqueamos estas moléculas utilizando anticuerpos neutralizantes. Los ratones fueron tratados vía intraperitoneal con un anticuerpo neutralizante de IL-17A o de la forma activa de TGF- $\beta$  (100ng/ratón) 24 horas antes de la administración de CTGF y posteriormente cada 72 horas hasta el sacrificio a los 10 días (figura 9).

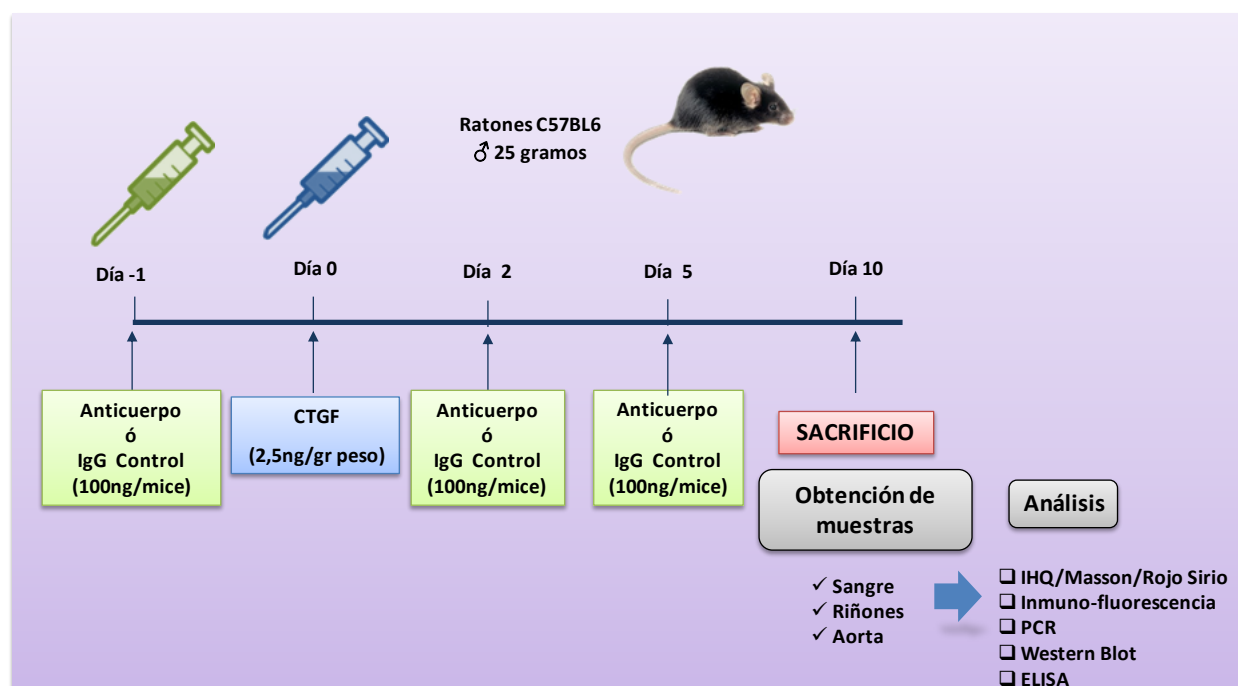


FIGURA 9: Esquema del protocolo de neutralización en el modelo de administración sistémica de CTGF. n= 5 animales por grupo



Como control se emplearon ratones inyectados con CTGF y la IgG control correspondiente (100ng/ratón) según el anticuerpo neutralizante empleado como se detalla en la tabla 2. La dosis de los anticuerpos y los tiempos empleados se basa en estudios previos (Das J 2009).

Anticuerpo	IgG Control	Dosis Anticuerpo/IgG	Casa comercial
Anti-IL17A	IgG de ratón Isotipo K1	100ng/ratón	E-bioscience
Anti-TGF- $\beta$ (pan específico)	IgG de conejo	100ng/ratón	R&D

**TABLA 2:** Listado de anticuerpos utilizados en el modelo de neutralización, dosis y controles.

## **1.2. MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO RENAL EN RATA**

### **1.2.1. MODELO DE INFUSIÓN DE ANGIOTENSINA II.**

El modelo se realizó como se ha descrito previamente por nuestro grupo (Rupérez M 2003). Se utilizaron ratas de la cepa Wistar normotensas de 3 meses de edad (150-180gr). La infusión de Ang II (dosis de 100 ng/Kg/min) se realizó mediante la implantación subcutánea de minibombas osmóticas (Alza Corp.), que permiten la liberación del péptido a velocidad y concentración constante. La cirugía se realizó bajo anestesia inducida por isoflurano. A las dos semanas los animales fueron sacrificados y se examinaron los riñones. Como control se incluyó un grupo infundido con salino. Los animales infundidos con AngII durante 2 semanas presentaron un aumento en la tensión sanguínea moderado (Ang II:  $149 \pm 3$  mm Hg, control:  $119 \pm 1$  mm Hg,  $p < 0,05$ ;  $n = 10$  animales por grupo).

### **1.2.2. MODELO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA POR ADMINISTRACIÓN DE STZ.**

Para los estudios de nefropatía diabética se realizó un modelo de inducción de nefropatía por inyección de STZ como se describe en (Ares-Carrasco S 2009). Ratas macho de la cepa Wistar fueron de 6 semanas de edad (130-150 gr) fueron inyectadas tres veces con estreptozotocina (50mg/kg/día) o vehículo (0,01 mol/L tampon citrato pH 4,5). La glucosa en sangre se controló dos veces por semana con un glucómetro. Cuando fue necesario se administró insulina (Insulatard NPH) por inyección intramuscular para la hiperglucemia, manteniendo la glucosa en sangre  $> 400$  mg/dl. A las 22 semanas los animales se sacrificaron y se estudiaron los riñones. Como controles se utilizaron ratas macho de 28 semanas de edad. Los valores de presión sanguínea, proteinuria y albuminuria al tiempo del estudio se muestran en la tabla 3.

### **1.2.3 RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS.**

Para este modelo se utilizaron ratas de la cepa SHR que desarrollan hipertensión de manera espontánea. Se utilizaron ratas macho que se sacrificaron a las 6 semanas de edad y se examinaron los

riñones. Como controles se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con la misma edad. Los valores de presión sanguínea, proteinuria y albuminuria al tiempo del estudio se muestran en la tabla 3.

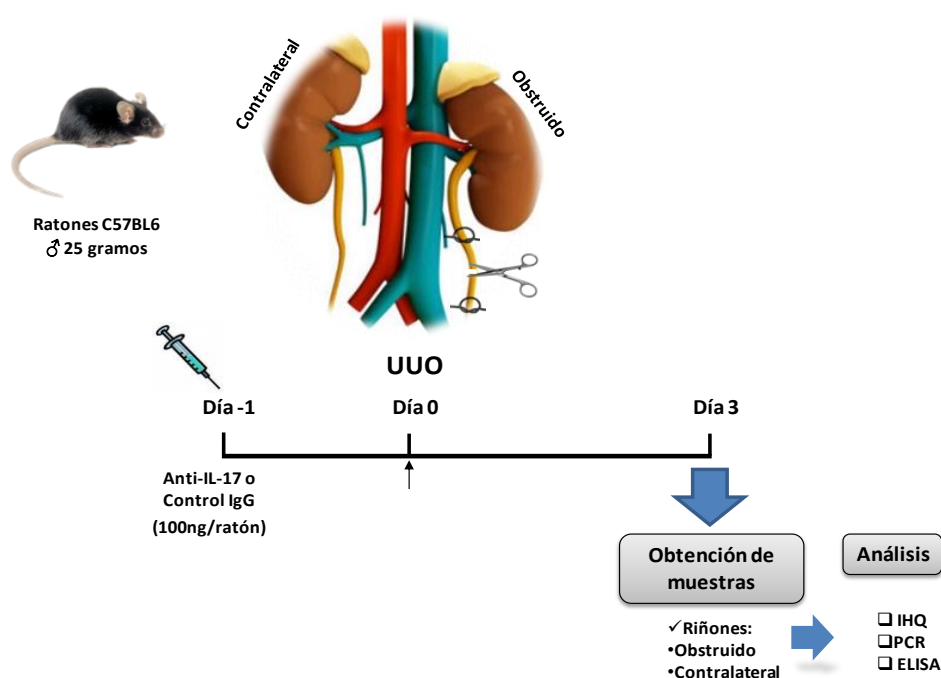
	Presión Sanguínea (mmHg)	Proteinuria (mg/24h)	Albumina en orina ( $\mu$ g/24h)
<b>Control</b>	112,0 $\pm$ 3,9	4,5 $\pm$ 1,8	0,44 $\pm$ 0,3
<b>SHR</b>	143,1 $\pm$ 10,2	8,8 $\pm$ 3,6	2,00 $\pm$ 0,7
<b>Diabéticas</b>	121,2 $\pm$ 4,8	8,6 $\pm$ 3,6	2,31 $\pm$ 0,4

**TABLA 3: Valores de parámetros biológicos. N= 6 ratas por grupo.**

En todos los casos la presión arterial sistólica fue medida en ratas conscientes con un esfigmomanómetro en la vena dorsal de la cola (NARCO Biosystems). El valor de la presión sanguínea para cada rata fue calculado como la media de tres medidas separadas en cada sesión.

### 1.3. MODELO DE OBSTRUCCIÓN UNILATERAL DEL URETER. BLOQUEO DE IL-17A

El modelo se realizó según el protocolo previamente descrito por nuestro grupo (Esteban V 2004). 24 horas antes de la cirugía los ratones fueron tratados con un anticuerpo frente a IL-17A (100ng/ratón) o IgG de ratón isotipo K1, utilizado como grupo control (tabla 2). La cirugía se realizó bajo anestesia inducida por isofluorano. Posteriormente se procedió a la ligación del uréter izquierdo con un hilo de sutura (4/0) no absorbible en dos puntos suficientemente separados, para prevenir la infección del tracto urinario, por último se realizó un corte entre ambas ligaduras (riñón obstruido) (figura 10). Como control adicional se utilizó el riñón que no ha sufrido cirugía (riñón contralateral). Los animales se sacrificaron a los 3 días.



**FIGURA 10: Esquema del protocolo de neutralización de IL-17A en el modelo UUO. n= 5 ratones por grupo.**

#### 1.4. MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO PERITONEAL POR INSTILACIÓN DE LÍQUIDO DE DIÁLISIS EN RATÓN.

El modelo se realizó siguiendo el protocolo descrito por el grupo de R. Selgas (Aroeira LS 2008). Este modelo permite reproducir el daño causado por el líquido de diálisis en la membrana peritoneal debido a diversos factores como el daño mecánico y la bioincompatibilidad de fluidos pero siempre teniendo en cuenta que los ratones poseen los dos riñones funcionales por lo que se descartan los efectos debidos a la uremia (González-Mateo GT 2008). A los ratones se les implantó un catéter intraperitoneal conectado a un acceso subcutáneo situado en la zona dorsal (PennyPort; Access Technologies, Skokie, IL, USA). Durante la primera semana tras la cirugía se administró, a través del catéter, 0,2 ml de salino y 1 UI/ml de heparina para facilitar la cicatrización de la herida. Posteriormente los ratones se dividieron en grupos al azar, un grupo de ratones (**LD**) fue instilado diariamente con 2 ml de una solución de diálisis estándar (Stay Safe: tampón lactato 35 mmoles/L, 4,25% de glucosa, pH5,5), (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany). Elegimos este volumen por ser el equivalente al utilizado en pacientes en relación con el peso corporal y no afectaba a la capacidad pulmonar de los ratones. Los ratones sin tratar con líquido de diálisis fueron usados como grupo control (**control**). Los ratones se sacrificaron 7 o 30 días después del tratamiento con líquido de diálisis (figura 11).

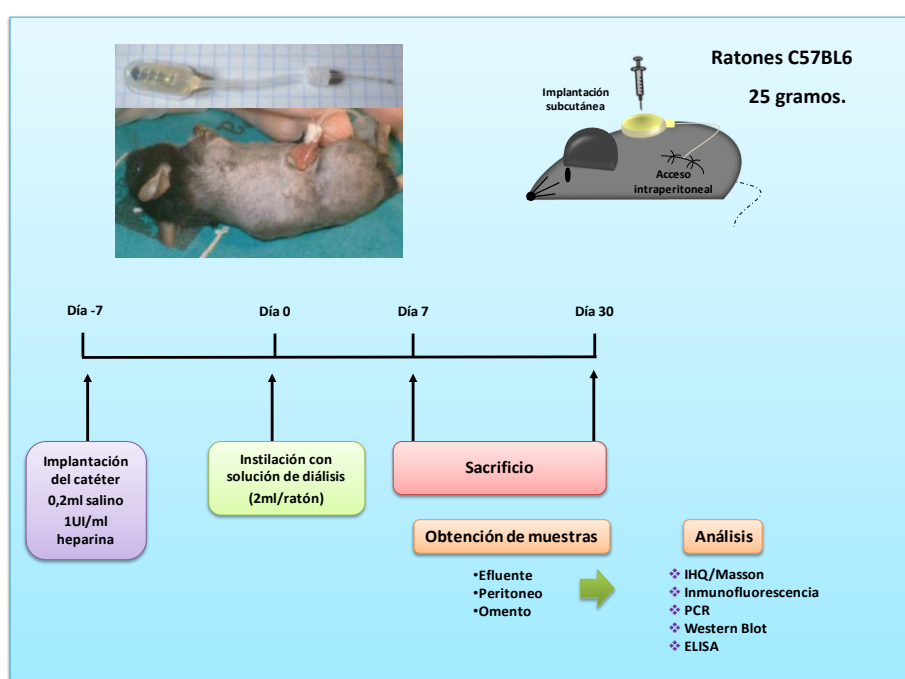
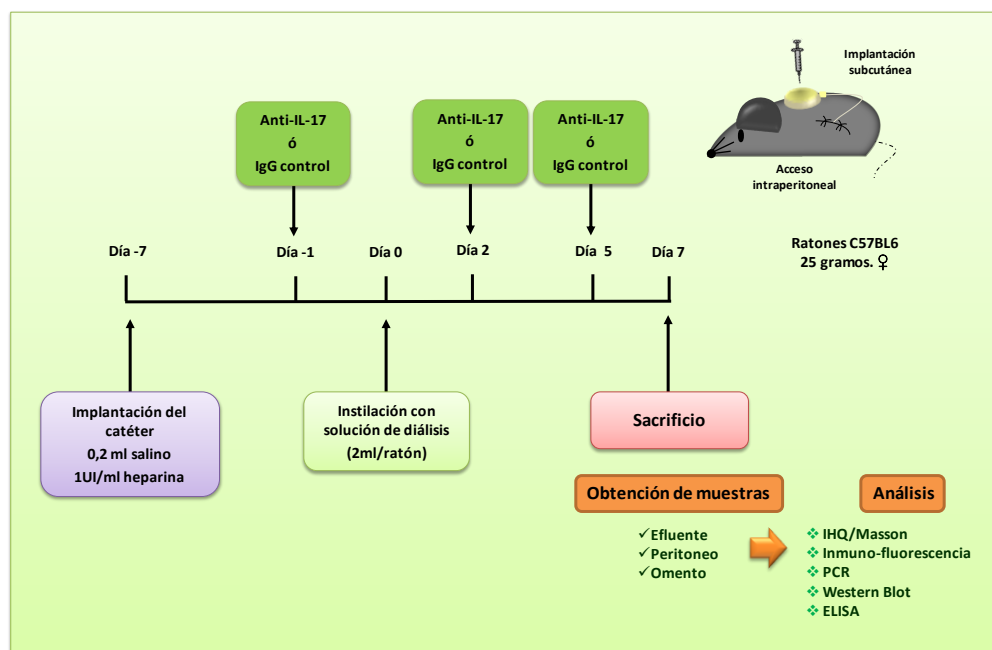


FIGURA 11: Esquema de los procedimientos seguidos en el modelo de daño peritoneal por instilación de líquido de diálisis. n = 6 animales por grupo.

##### 1.4.1. NEUTRALIZACIÓN DE IL-17A.

Utilizamos un anticuerpo neutralizante para bloquear los efectos de IL-17A en el grupo tratado durante 7 días con LD. Los ratones fueron tratados con un anticuerpo neutralizante de IL-17A 24 horas antes de la instilación con LD y posteriormente cada 72 horas hasta el sacrificio, la administración se realizó a través del catéter figura 12. Como control se utilizó una IgG como se describe en la tabla 2. El

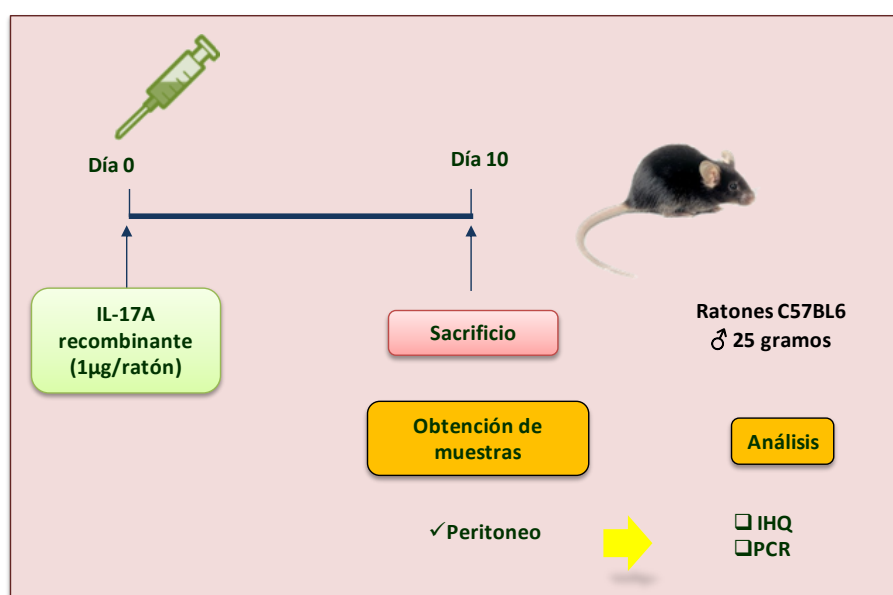
número final de ratones analizados fue de 6 ratones en el grupo con IgG control y de 7 ratones en el grupo tratado con anticuerpo frente a IL-17A.



**FIGURA 12: Protocolo de neutralización de IL-17A en el modelo de daño peritoneal por instilación de líquido de diálisis.**

### 1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO PERITONEAL POR INYECCIÓN DE IL-17A EN RATÓN.

Para comprobar los efectos de IL-17A en el peritoneo se realizó un modelo de administración de IL-17A recombinante. A los ratones se les administró, por vía intraperitoneal, una única dosis (1 $\mu$ g/ ratón) de IL-17A recombinante humana (R&D systems) disuelta en salino. La dosis empleada fue igual a la utilizada en otros estudios *in vivo* (Witowski J 2007) y equivalente con la medida de bioactividad proporcionada por la casa comercial. Los ratones fueron sacrificados a los 10 días (figura 13). Como control utilizamos ratones inyectados con salino por vía intraperitoneal. El número de ratones estudiados fue de 6 por grupo.



**FIGURA 13: Esquema del modelo experimental de administración sistémica de IL-17A en ratón.**

## 2. ESTUDIOS EN PACIENTES

### 2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS HISTOLÓGICAS.

Las muestras de peritoneos humanos provienen de peritoneo parietal de la pared abdominal anterior de pacientes en diálisis peritoneal y fueron extraídas por cirujanos, bien durante la inserción o retirada del catéter de diálisis, o durante la realización de cirugía abdominal. En el grupo control las muestras se obtuvieron de donantes de órganos, en el momento de la extracción o en autopsias de pacientes sin patología renal o abdominal. Las biopsias renales fueron obtenidas del Banco de Tumores del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. El tejido fue fijado en una solución formol salina, incluido en parafina y cortado en micrótopo para obtener secciones de tejido de unas 4  $\mu\text{m}$  de grosor.

### 2.2. EFLUENTE PERITONEAL

Las soluciones de diálisis drenada (o efluentes) se obtuvieron a partir de bolsas de diálisis de pacientes en diálisis peritoneal continuada ambulatoria, provenientes de la unidad de diálisis peritoneal del Hospital de la Paz, Madrid, España. Del volumen de líquido total recogido de los pacientes (volumen variable en función del grado de ultrafiltración de cada paciente) se recolectaron 100 ml y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En todos los casos se informó al paciente, se realizó un tratamiento confidencial de los datos clínicos, y se obtuvo la autorización previa para la realización de las biopsias. Todos los estudios cumplen la normativa de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por los comités éticos correspondientes de cada institución.

## 3. ENSAYOS IN VITRO.

Para los experimentos *in vitro* empleamos varias líneas celulares; células túbuloepiteliales humanas (HK2) y murinas (MCT) y fibroblastos renales (TFB). Para los estudios de células mesoteliales realizamos un cultivo primario a partir de omento obtenido de pacientes sometidos a cirugía abdominal no relacionada con diálisis peritoneal ambulatoria según se describe en (Yáñez-Mó M 2003). Las células mesoteliales de omento (HOMC) se obtuvieron por digestión del epiplón con tripsina durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguido de centrifugación (1200 rpm; 10 minutos;  $4^{\circ}\text{C}$ ). Cada tipo celular se creció en medio de cultivo específico según se describe en la tabla 4. Posteriormente las células se estimularon con IL-17A recombinante (10ng/ml) (R&D systems) utilizando la dosis descrita en Shahrara S 2009.

CÉLULAS	FUENTE	MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO	SUPLEMENTOS
Epiteliales de túbulo proximal humanas <b>HK2</b>	Colección Americana de cultivos tipo (ATCC) CRL-2190	RPMI 1640 (Lonza) <b>Suero bovino fetal</b> (origen Sudamérica) (Lonza) <b>10%</b> 37 °C CO <sub>2</sub> 5%	<b>Glutamina 1%</b> (Lonza) <b>Penicilina 100U/ml</b> (Lonza) <b>Estreptomycin a 100 µg/ml</b> (Lonza)
Epiteliales de túbulo proximal murinas <b>MCT</b>	Dr. Eric Neilson (Universidad de Vanderbilt)	RPMI 1640 (Lonza) <b>Suero bovino fetal</b> (origen Sudamérica) (Lonza) <b>10%</b> 37 °C CO <sub>2</sub> 5%	<b>Glutamina 1%</b> (Lonza) <b>Penicilina 100U/ml</b> (Lonza) <b>Estreptomycin a 100 µg/ml</b> (Lonza)
Fibroblastos renales murinos <b>TFBs</b>	Dr. Eric Neilson (Universidad de Vanderbilt)	RPMI 1640 (Lonza) <b>Suero bovino fetal</b> (origen Sudamérica) (Lonza) <b>10%</b> 37 °C CO <sub>2</sub> 5%	<b>Glutamina 1%</b> (Lonza) <b>Penicilina 100U/ml</b> (Lonza) <b>Estreptomycin a 100 µg/ml</b> (Lonza) <b>Insulina transferrina selenito sódico (ITS)</b> <b>5 µg/mL</b> (Sigma) <b>Hidrocortisona 36ng/ mL</b> (Sigma)
Mesoteliales humanas <b>HOMC</b>	Cultivo primario Omento de pacientes cirugía abdominal	RPMI 1640 (Lonza) <b>Suero bovino fetal</b> (origen Sudamérica) (Lonza) <b>20%</b> 37 °C CO <sub>2</sub> 5%	<b>Glutamina 1%</b> (Lonza) <b>Penicilina 100U/ml</b> (Lonza) <b>Estreptomycin a 100 µg/ml</b> (Lonza) <b>Insulina transferrina selenito sódico (ITS)</b> <b>5 µg/mL</b> (Sigma) <b>Hidrocortisona 36ng/ mL</b> (Sigma)

TABLA 4: Células utilizadas en los experimentos *in vitro*, origen y condiciones de cultivo

#### 4. ESTUDIOS MORFOLOGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS.

##### 4.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.

Las muestras de tejido incluido en parafina se cortaron con micrótopo en secciones de 4 µm y fueron montadas en portaobjetos de carga positiva (Dako FLEX IHC). Para el desparafinado e hidratación del tejido, las muestras mantuvieron en la estufa a 60°C durante 1 hora y posteriormente se incluyeron en xileno durante 10 minutos y en un gradiente decreciente de alcohol etílico (100°: 5min, 96°: 5min y 70°: 5min). La morfología del riñón y el peritoneo se contrastó empleando la técnica de tinción tricrómica de Masson (Masson P 1929) y la de las aortas mediante la técnica de rojo sirio (Sweat F 1964). Posteriormente, se evaluaron las muestras mediante microscopia óptica. En las muestras de peritoneo, teñidas con la técnica de Masson, se realizaron medidas morfométricas del grosor de la pared desde un extremo a otro de la sección haciendo medidas cada 150 µm.

##### 4.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las técnicas inmunohistoquímicas se emplearon tanto para caracterizar el número de células inflamatorias específicas como para evaluar la presencia de determinadas citoquinas y quimioquinas y su localización. El desparafinado, hidratación de las muestras y la recuperación de epítomos se realizó simultánea y automáticamente utilizando el sistema PT-link de Dako. Este sistema permite seleccionar el modo de recuperación de antígeno entre bajo y alto pH, según las especificaciones para cada anticuerpo (tabla 5). Para realizar las distintas tinciones inmunohistoquímicas se utilizó el sistema automatizado

Autostainer de Dako según el protocolo específico para cada anticuerpo como se detalla en la tabla 4. Este sistema emplea como anticuerpo secundario un polímero conjugado con peroxidasa (Envision Flex™) que es capaz de reconocer anticuerpos primarios de ratón y de conejo. Para anticuerpos primarios realizados en otro huésped se puede emplear una molécula (*linker*) que permite la unión entre el anticuerpo primario y el polímero, este procedimiento permite, además amplificar la señal del anticuerpo. Este equipo permite una mayor reproducibilidad de la técnica de tinción, el manejo de un mayor volumen de muestras, minimiza el fondo de la muestra y disminuye las uniones inespecíficas.

Recuperación de antígeno	Bloqueo peroxidasa endógena	Anticuerpo primario	Dilución Tiempo	Auxiliar	Anticuerpo secundario	Sustrato	Contraste
pH Bajo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10% en H <sub>2</sub> O	F4/80 (Serotec)	1/5000 30 min	Linker Rata	EnVision FLEX /HRP	DAB	Hematoxilina
pH Alto	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10% en H <sub>2</sub> O	CD3 (Dako)	Prediluido 20min		EnVision FLEX /HRP	DAB	Hematoxilina
pH Alto	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10% en H <sub>2</sub> O	CD4 (Dako)	Prediluido 20min		EnVision FLEX /HRP	DAB	Hematoxilina
pH Bajo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10% en H <sub>2</sub> O	IL-17 (Abcam)	1/250 30min		EnVision FLEX /HRP	DAB	Hematoxilina

**TABLA 5: Listado de anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica. Condiciones empleadas. Diluciones y casas comerciales.**

#### 4.3. INMUNOFLUORESCENCIA

Las muestras criopreservadas en OCT se cortaron con criostato en secciones de 4µm, se colocaron en portaobjetos de poly-L-Lisina y se conservaron a -80°C. Posteriormente, las muestras se fijaron en una solución de formol salino al 4% durante 10 minutos. Para evitar uniones inespecíficas las secciones se bloquearon durante 1 hora a Tª ambiente con PBS/BSA 10% y 4% del suero correspondiente. Se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C y, posteriormente, con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa488 o Alexa633 durante 1 hora a Tª ambiente. Después de cada paso anterior las muestras se lavaron con PBS y Tween al 0.05%. En el caso de dobles tinciones, después de lavar el anticuerpo secundario se bloqueó de nuevo la muestra y se repitieron los mismos pasos; añadiendo el otro anticuerpo primario y un anticuerpo secundario conjugado con un cromógeno distinto para poder diferenciar las dos tinciones. Los núcleos se contrastaron con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (Sigma) y se montaron con Mowiol 40-88 (Sigma). Los anticuerpos utilizados, tiempos y diluciones se detallan en la tabla 6.

Bloqueo	Anticuerpo primario	Dilución Tiempo	Anticuerpo secundario
PBS 1% BSA 10% Suero Oveja 4%	F4/80 (Serotec)	1/5000 O/N 4° C	Anti-Rata Conjugado con Alexa 488 (hecho en cabra)
PBS 1% BSA 10% Suero Oveja 4%	CD3 (Dako)	1/250 O/N 4°C	Anti-Conejo Conjugado con Alexa 488 (hecho en cabra)
PBS 1% BSA 10% Suero Oveja 4%	CD4 (Dako)	1/250 O/N 4°C	Anti-ratón conjugado Alexa655 (hecho en cabra)
PBS 1% BSA 10% Suero Oveja 4%	IL-17 (Abcam)	1/250 O/N 4°C	Anti-Conejo Conjugado con Alexa 488 (hecho en cabra)

**TABLA 6: Listado de anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia. Condiciones empleadas. Anticuerpos secundarios. Diluciones y casas comerciales.**

## 5. ANÁLISIS PROTEICOS.

Las proteínas se extrajeron del tejido congelado en nitrógeno líquido mediante pulverización en un homogeneizador metálico estéril en un tampón de lisis que contiene Tris-HCl (50 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (2 mmol/L); etilenglicol tetraacético (EGTA) 2 mmol/L; Triton X-100 (0,2%); NP-40 (0,3%); fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1 mmol/L) coctel de inhibidores de proteasas (1 µl/ml), fluoruro sódico (NaF) (25 mmol/L); Ortovanadato sódico (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) (100 µM) y Ditiotreitól (DTT) 1mM todo de Sigma. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas mediante método del ácido bicinconínico (BCA de Pierce).

### 5.1. TÉCNICA DE ELISA

Los niveles de producción de citoquinas se determinaron mediante ensayos de inmunoabsorción (ELISA). Los extractos proteicos obtenidos del tejido (riñón, aorta, peritoneo) se cuantificaron y posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas para obtener alícuotas de la misma concentración (10 ng/ml) por muestra. Empleando un volumen de 10 µl determinamos los niveles de IFN-γ IL-4, IL-17A, IL-6 y TGF-β (eBioscience) y de MCP-1 y RANTES (BD Bioscience). El plasma de ratones (50 µl) se utilizó para evaluar los niveles de IL-17A (eBioscience) circulantes. El líquido de diálisis obtenido de pacientes se concentro por filtración en tubos de centrifuga (Amicon Ultra-15, Millipore) y se utilizó para valorar los niveles de IL-17A (ebioscience).

### 5.2. TÉCNICA DE WESTERN BLOT

Los extractos de proteínas de los tejidos (30-50 µg/ml) se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (8-12%) en condiciones reductoras. Las muestras se transfirieron a membranas de fluoruro de



polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad), antes de añadir el anticuerpo primario, se bloquearon las membranas durante una hora con leche descremada en polvo (5% en TBS con 0,1% de Tween-20) para evitar uniones inespecíficas. Tras una noche con el anticuerpo primario (diluido en la solución de bloqueo) se incubaron durante el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Amersham). Las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia usando el kit ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Las autorradiografías obtenidas se escanearon utilizando el densitómetro calibrado Gel Doc™ EZ imager y se analizaron con el programa Image Lab 3.0 ambos de Bio-Rad.

Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-RORyt [1:1000] y anti-Foxp3 [1:1000] (eBioscience), anti-STAT-3 fosforilado [1:1000] (Cell Signaling), anti-IL-17 [1:1000] (Abcam), anti-MCP-1 [1:500] (Becton Dickinson) y anti-RANTES [1:1000] (Chemicon). El control de carga de las proteínas y la eficacia de transferencia se determinaron utilizando un anticuerpo anti GAPDH 1:5000 (Chemicon) o anti- $\alpha$ -Tubulina 1:10000 (Sigma).

## 6. ANÁLISIS GENÉTICOS.

El ARN total se aisló de las muestras de tejido congelado y pulverizado mediante el método del Trizol®. El ADNc fue sintetizado a partir de 2  $\mu$ g de ARN total utilizando el Kit de alta capacidad de síntesis de ADNc de Applied siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la expresión génica del ADNc obtenido fue analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real con el sistema de detección de secuencias de 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Se realizó un análisis multiplex empleando cebadores marcados con fluoróforo FAM prediseñados por Applied (tabla 7), para detectar el gen correspondiente y un cebador para ARN 18s ribosómico eucariótico marcado con un fluoróforo VIC para la normalización de datos. La Tª y número de ciclos fue la siguiente: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, 1 ciclo de 95°C de 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto, en este último paso es donde se hacen las mediciones.

La detección de la expresión de IL-17A se realizó con Syber Green y se normalizó analizando la expresión del ARN 18s ribosómico utilizando los cebadores que se indican en la tabla 6. Con los siguientes pasos: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, 1 ciclo de 95°C de 10 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 40 segundos y 72°C durante, por último un ciclo de disociación de 95°C y 60°C durante un minuto. Las mediciones se realizaron durante el paso de 72°C. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado, el número de copias de ARNm se calculó usando el programa incluido en el instrumental a partir del valor Ct (ciclo umbral). Los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de 18s.

GEN	FLUORÓFORO/ESPECIE	NÚMERO IDENTIFICADOR O SECUENCIA
MCP-1	FAM /ratón	Mm00441242_m1
RANTES	FAM /ratón	Mm01302428_m1
IL-6	FAM /ratón	Mm00446190_m1
TGF- $\beta$	FAM /ratón	Mm01178819_m1
CCR2	FAM /ratón	Mm-99999051-Gh
CXCL1	FAM /ratón	Mm04207460_m1
VEGF	FAM /ratón	Mm00437304_m1
$\alpha$ -SMA	FAM /ratón	Mm01546133_m1
Fibronectina	FAM /ratón	Mm01256734_m1
CTGF	FAM /ratón	Mm00515790_g1
MCP-1	FAM /humano	Hs00234140_m1
RANTES	FAM /humano	Hs00174575_m1
IL-6	FAM /humano	Hs00985639_m1
TGF- $\beta$	FAM /humano	Hs99999918_m1
Pro-colágeno tipo I	FAM /humano	Hs00164004_m1
18s ARN	VIC / eucariota	4310893E
IL-17A	SYBER GREEN/ratón	Sentido: 5'-GGACTCTCCACCGCAATGA Antisentido: 5'- GACCAGGATCTCTTGCTGGA
18s ARN	SYBER GREEN/eucariota	Sentido: 5'CCGTCGTAGTTCGACCATAA3' Antisentido: 5' CAGCTTTGCAACCATACTCCC 3'

TABLA 7: Listado de cebadores utilizados para el análisis génico por PCR a tiempo Real.

## 7. CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se analizó el plasma de ratón, obtenido por centrifugación (2500 rpm, 10 minutos) de muestra de sangre total, por citometría de flujo para determinar los niveles de linfocitos T circulantes. La superficie de las células fue teñida con un anticuerpo anti-CD3 marcado con tiocianato de fluoresteina (FITC) (específico para linfocitos T) y un anticuerpo anti-CD4 (para linfocitos Th) o anti CD8 (para linfocitos T citotóxicos) marcado con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen), siguiendo las instrucciones suministradas por la casa comercial. Posteriormente las células fueron permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo de detección de Foxp3 marcado con biotina (BD Pharmingen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience) y se analizó con el software Cell Quest Pro.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La cuantificación de las tinciones inmunohistoquímicas se realizó con el Software Image Pro-Plus. Se realizaron mediadas de 5 campos visuales de una magnitud de 200x para cada muestra y se cuantificó el área teñida con respecto del área total, los resultados se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los resultados de los análisis de niveles de proteína y ARN se expresaron como incrementos de n-veces respecto al control como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

El análisis estadístico de todos los resultados se realizó con el software estadístico SPSS versión 11.0. En primer lugar se comprobó que las muestras fueran normales (prueba de Kolmogorov – Smirnov), en los casos en los que esté supuesto fue cierto se realizó una análisis comparativo de las medias utilizando el test paramétrico T-Student, en el caso de no ser muestras normales se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. En cualquiera de los casos las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .





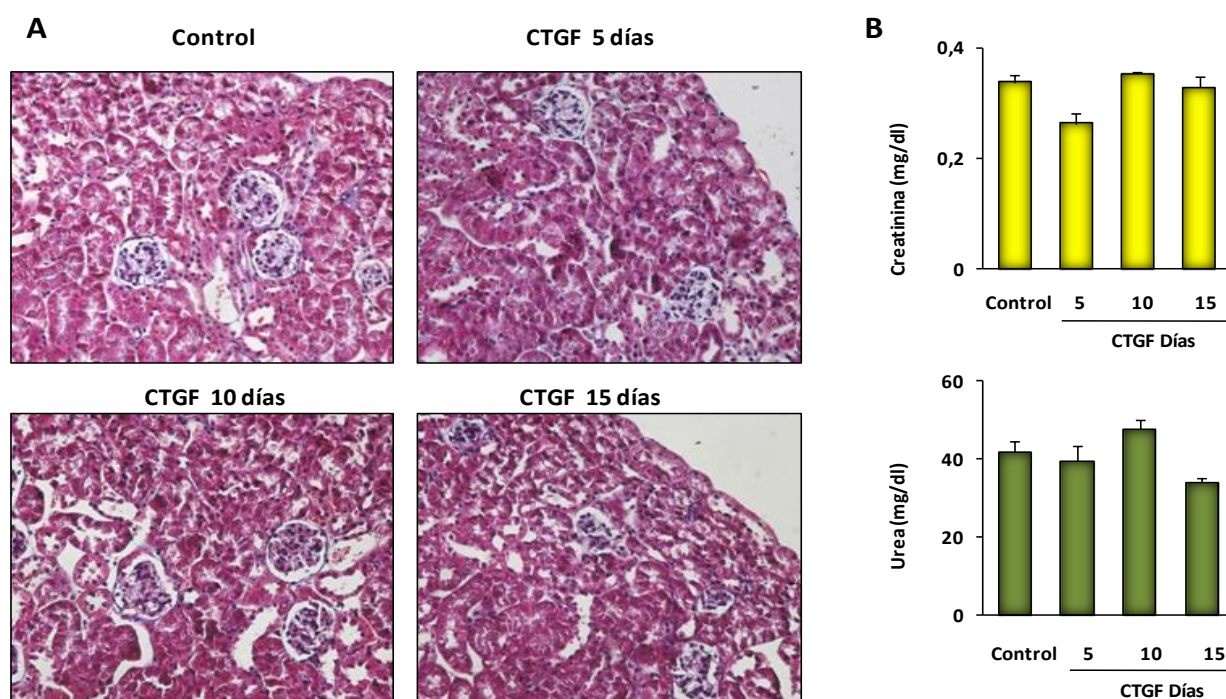
## ***IV. RESULTADOS***



## 1. ESTUDIOS *IN VIVO* DE CTGF.

### 1.1. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE CTGF EN LA MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN RENAL EN RATÓN

Aunque se ha descrito una inducción local de la expresión de CTGF en numerosas patologías renales asociado a la presencia de fibrosis (Spagnoli A 2005; Blom IE 2002; Gupta S 2000, Cicha I 2005, Leask A 2002; Yokoi H 2002; Rachfal AW 2005), existen pocos datos a cerca del efecto *in vivo* de CTGF *per se*. Recientemente nuestro grupo ha descrito la participación directa de CTGF en la inducción de una respuesta inflamatoria renal aguda asociada a la activación del factor NF- $\kappa$ B (Sanchez-Lopez E 2009a). Sin embargo, se desconocen los efectos sobre el riñón de una exposición más prolongada. Para de evaluar los efectos a largo plazo de CTGF *in vivo* en el riñón realizamos un modelo de administración sistémica vía intraperitoneal de CTGF recombinante (2.5 ng/g de peso) en ratones machos C57BL/6 y estudiamos el efecto causado a 5, 10 y 15 días. La evaluación morfológica de las muestras renales mostró únicamente un aumento focal del infiltrado inflamatorio intersticial en respuesta a CTGF, a todos los tiempos estudiados. Sin embargo, no se observó ningún cambio en la morfología (sin evidencia de daño glomerular o tubular), ni se detectó aumento significativo del depósito de proteínas de matriz extracelular (figura 14A). La actividad de la función renal, evaluada indirectamente por los niveles de creatinina y urea en sangre, tampoco mostró diferencias significativas entre controles y ratones inyectados con CTGF (figura 14B).

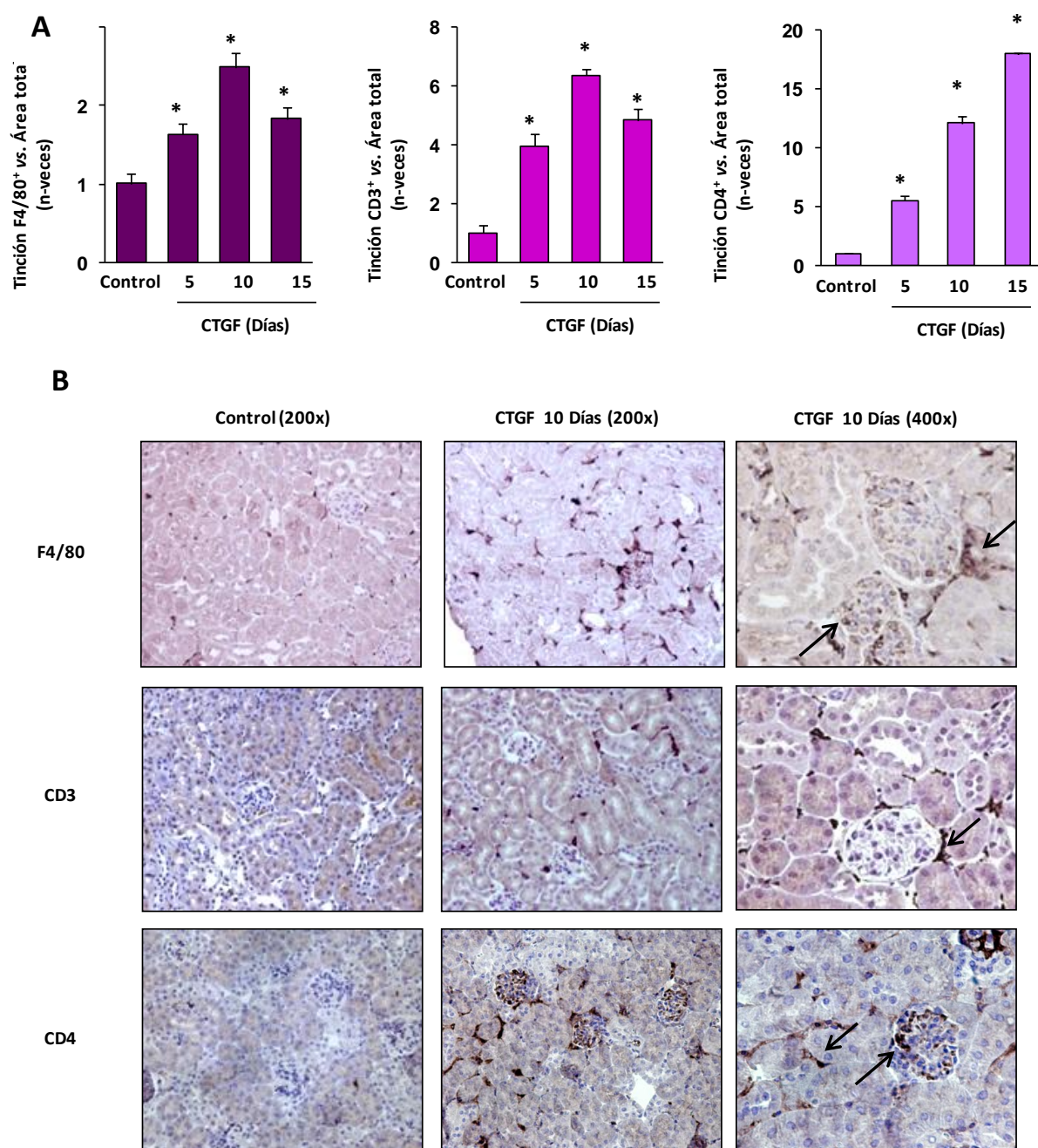


**FIGURA 14. La administración sistémica de CTGF en ratón no indujo cambios en la morfología y función renal.** Los ratones C57BL/6 fueron inyectados *i.p.* con CTGF (2.5ng/gr peso corporal) y sacrificados después de 5, 10 o 15 días. La morfología renal y la presencia de depósitos de colágeno se evaluaron mediante tinción tricrómica de Masson. La figura A muestra una micrografía representativa de 1 animal de cada grupo (200x). El tejido conectivo se tiñe de azul, los núcleos de morado, y el citoplasma en rojo. La figura B muestra los valores medios de creatinina y urea determinados en plasma. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo.



## 1.2. CTGF INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL CRÓNICA.

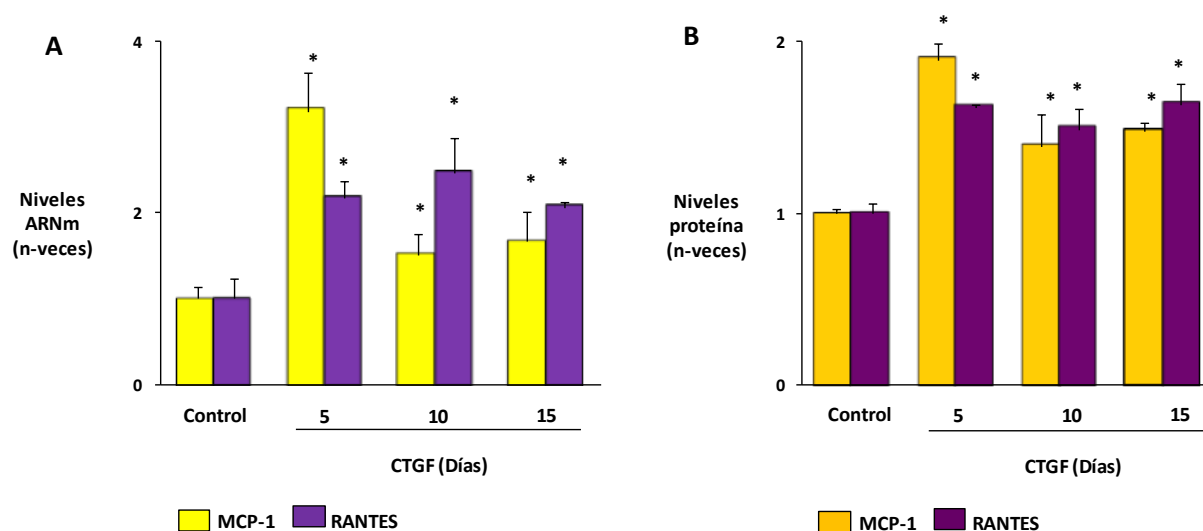
Con el fin de caracterizar la respuesta renal inflamatoria observada en los ratones tratados con CTGF, examinamos el componente celular del infiltrado inflamatorio mediante estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos específicos para reconocer monocitos/macrófagos y células T (figura 15).



**FIGURA 15. La administración sistémica de CTGF en ratones causó infiltrado inflamatorio en el riñón.** En secciones renales de ratones tratados con CTGF se caracterizaron y cuantificaron las células inflamatorias mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a F4/80 (específico para monocitos y macrófagos), CD3 (marcador de linfocitos T) y CD4 (marcador linfocitos Th). La figura A representa la cuantificación de las células positivas, representada como tinción positiva respecto a la superficie total y normalizada frente al control. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs. control. La figura B muestra un ejemplo representativo de un animal control y otro tratado con CTGF a 10 días (200x). Las flechas indican la presencia de células infiltrantes en detalle (400x) en un ratón tratado con CTGF a 10 días.



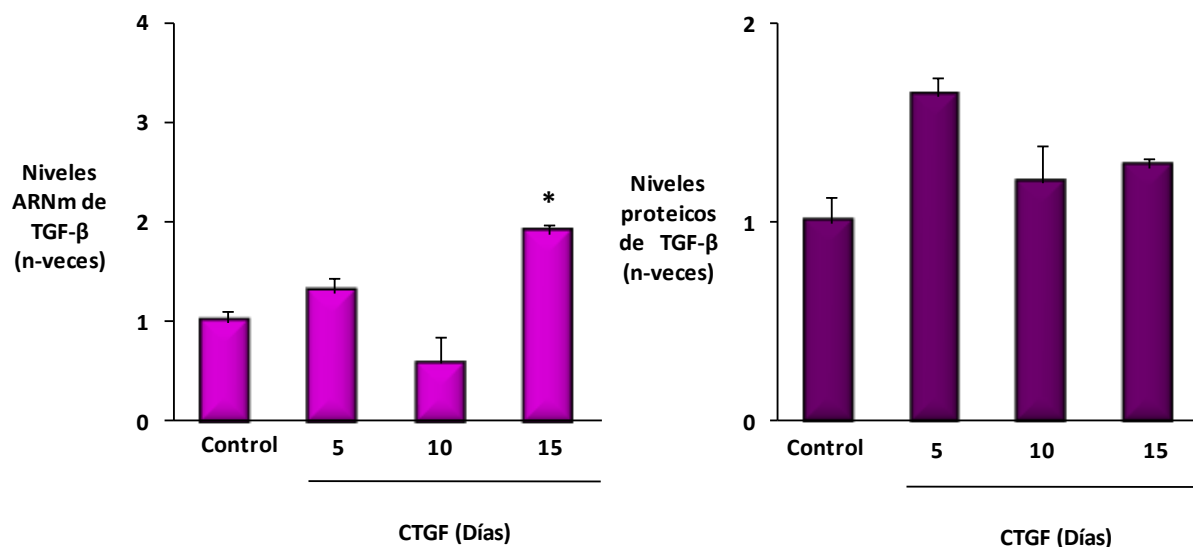
En los ratones tratados con CTGF encontramos un mayor número de células F4/80 positivas (monocitos/macrófagos) a todos los tiempos estudiados, con un pico máximo alcanzado a 10 días. Estas células se localizaron en el túbulo-intersticio y en los glomérulos figura 15B. La presencia de linfocitos T también estaba significativamente aumentada en ratones tratados con CTGF respecto de los controles, con un pico máximo para células CD3 positivas a 10 días, mientras que el mayor número de células CD4 se observaba a los 15 días (Figura 15). Junto con las células inflamatorias también valoramos la presencia de mediadores proinflamatorios en el riñón. Los ratones inyectados con CTGF presentaron un aumento en la expresión génica y proteica de las citoquinas proinflamatorias MCP-1 y RANTES, a todos los tiempos estudiados, comparado con los controles (figura 16). Todo estos datos indicaban la existencia de un proceso inflamatorio persistente en el tiempo.



**FIGURA 16. CTGF aumentó de la expresión de quimiocinas proinflamatorias en el riñón.** En las muestras renales de ratones control y tratados con CTGF evaluamos los niveles de expresión génica de MCP-1 y RANTES por PCR a tiempo real (A) y los niveles de proteína por ELISA (B). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo normalizados frente al control. \*  $p < 0.05$  vs. control.

### 1.3. CTGF INDUCE UNA RESPUESTA FIBRÓTICA TRANSITORIA EN EL RIÑÓN QUE DESAPARECE A LOS 10 DÍAS.

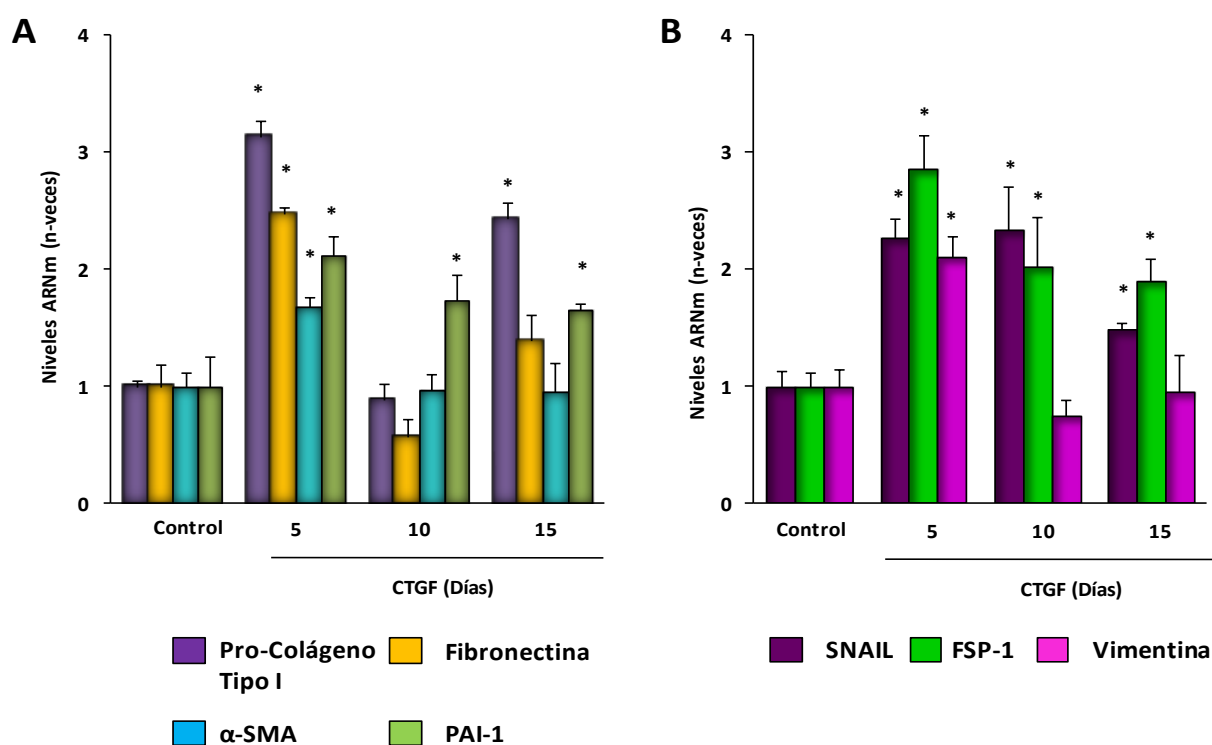
CTGF se ha considerado clásicamente como un mediador profibrótico, por lo que uno de nuestros objetivos fue investigar la expresión de distintos marcadores fibróticos en el riñón de los ratones tratados con CTGF. Entre los factores profibróticos mejor caracterizados se encuentra TGF- $\beta$ , se ha descrito que este factor es capaz por si solo de iniciar y mantener una respuesta profibrótica en diversos órganos (Santibañez JF 2011). A nivel renal, se observaron cambios significativos en los niveles de expresión proteica de TGF- $\beta$ , determinado por ELISA, entre los ratones control y los tratados con CTGF, a todos los tiempos estudiados; observándose únicamente un ligero aumento en la expresión génica de TGF- $\beta$ 1, determinado por PCR a tiempo real, a 15 días que no se traduce en un aumento a nivel de proteína (figura 17).



**FIGURA 17. CTGF no aumentó la expresión de TGF-β el riñón.** Los ratones C57BL/6 fueron inyectados con CTGF y sacrificados a los días 5, 10 o 15. En las muestras renales de ratones control y tratados con CTGF evaluamos los niveles de expresión génica por PCR a tiempo real (A) y los niveles de proteína por ELISA (B) de TGF-β. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo normalizados frente al control. \*  $p < 0.05$  vs. control.

En los ratones tratados con CTGF se observó un incremento en los niveles de ARNm de fibronectina, pro-colágeno Tipo I y actina de músculo liso vascular ( $\alpha$ -SMA), todos ellos marcadores característicos de fibroblastos activados (miofibroblastos) (Schurch W 1998) a 5 días, que regresaron a los valores basales a los 10 días. Los niveles de pro-colágeno tipo I aumentaron de nuevo a los 15 días (figura 18A). Por otro lado, observamos un incremento mantenido de la expresión génica del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (figura 18A). Estos resultados muestran que a nivel renal CTGF únicamente es capaz de iniciar una respuesta fibrótica transitoria a nivel génico, que no se traduce a nivel proteico (figura 14).

Además de los fibroblastos residentes, otra fuente de miofibroblastos son células de diversos orígenes (células túbuloepiteliales, endoteliales, derivadas de médula ósea o pericitos) que, por transición epitelio (o endotelio) mesenquimal (TEM), se transforman en fibroblastos. Estas células transdiferenciadas pierden sus características y comienzan a expresar marcadores mesenquimales como Vimentina o la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1). En la activación de este proceso están implicados varios factores, siendo el más caracterizado el factor de transcripción Snail (Liu Y 2010). En los riñones de ratones tratados con CTGF evaluamos la expresión de estos marcadores y observamos una activación de todos ellos a los 5 días, que se mantenía en el tiempo en el caso de FSP-1 y Snail, pero no en el de Vimentina (Figura 18B). Estos resultados muestran que CTGF podría estar modulando algunos de los factores relacionados con TEM en el riñón.

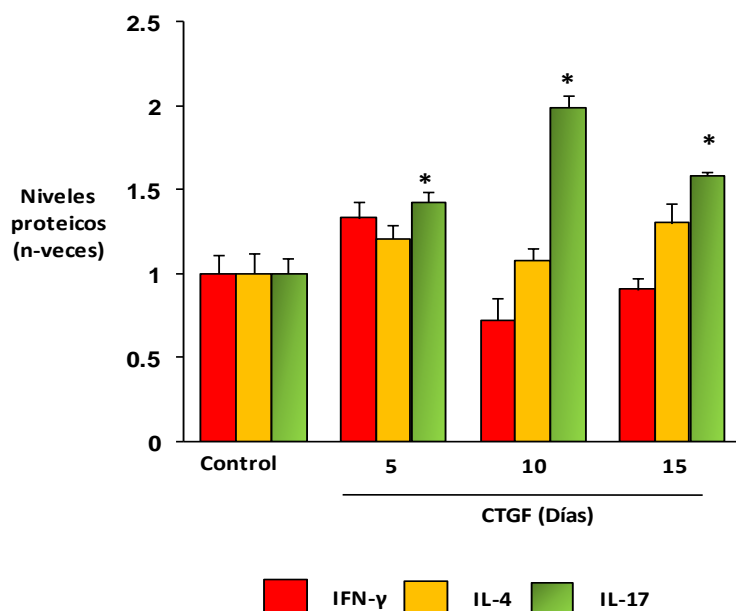


**FIGURA 18.** La administración sistémica de CTGF en ratones indujo una activación transitoria de genes pro-fibróticos (A) y relacionados con TEM (B). Los ratones C57BL/6 fueron inyectados con CTGF y sacrificados a los días 5, 10 o 15. El ARNm fue extraído de muestras de tejido renal y analizado por PCR a tiempo real. La figura muestra la expresión génica de varios factores profibróticos (A) y relacionados con TEM (B). Los datos se expresan como media±EEM de 5 a 10 animales por grupo, normalizada respecto al grupo control. \*  $p < 0.05$  vs. control.

#### 1.4. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR CTGF EN EL RIÑÓN.

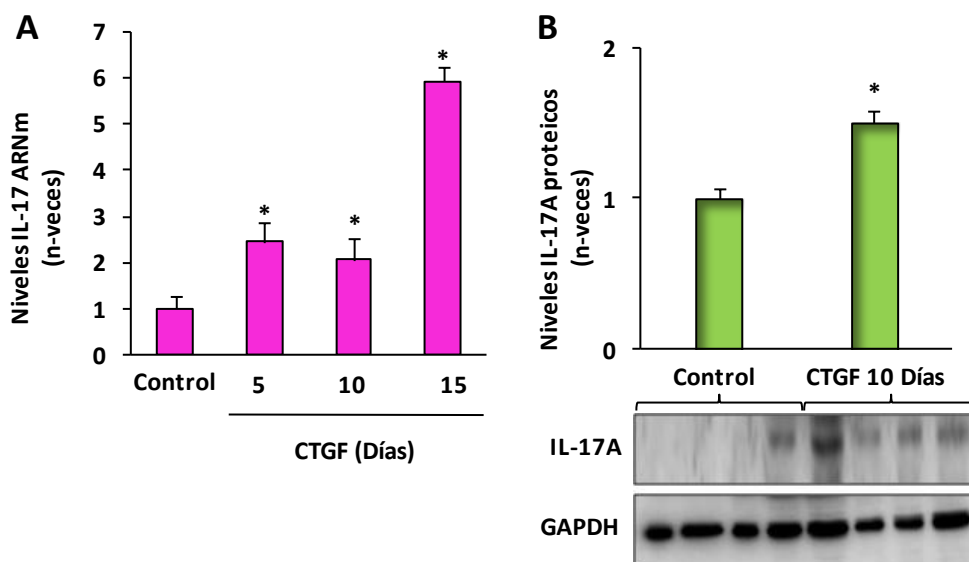
##### 1.4.1. EVALUACIÓN DE CITOQUINAS CARACTERÍSTICAS DE LAS RESPUESTAS INFLAMATORIAS TH1, TH2 Y TH17.

Una vez determinada la presencia de células inflamatorias, y debido a la importancia de las células T efectoras (Th) en la respuesta inmune quisimos evaluar que subtipo linfocitario Th estaba implicado en la respuesta mediada por CTGF a largo plazo. Para ello analizamos los niveles renales de las citoquinas claves en las tres respuestas: IFN- $\gamma$  e IL-4, citoquinas claves de las respuestas Th1 y Th2, respectivamente, e IL-17A la citoquina efectora de la respuesta Th17. Mediante ELISA determinamos que la expresión renal de IL-17A aumentaba significativamente en los ratones inyectados con CTGF respecto a los controles, con un pico máximo a 10 días. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de IFN- $\gamma$  o IL-4 en ningún grupo (figura 19).



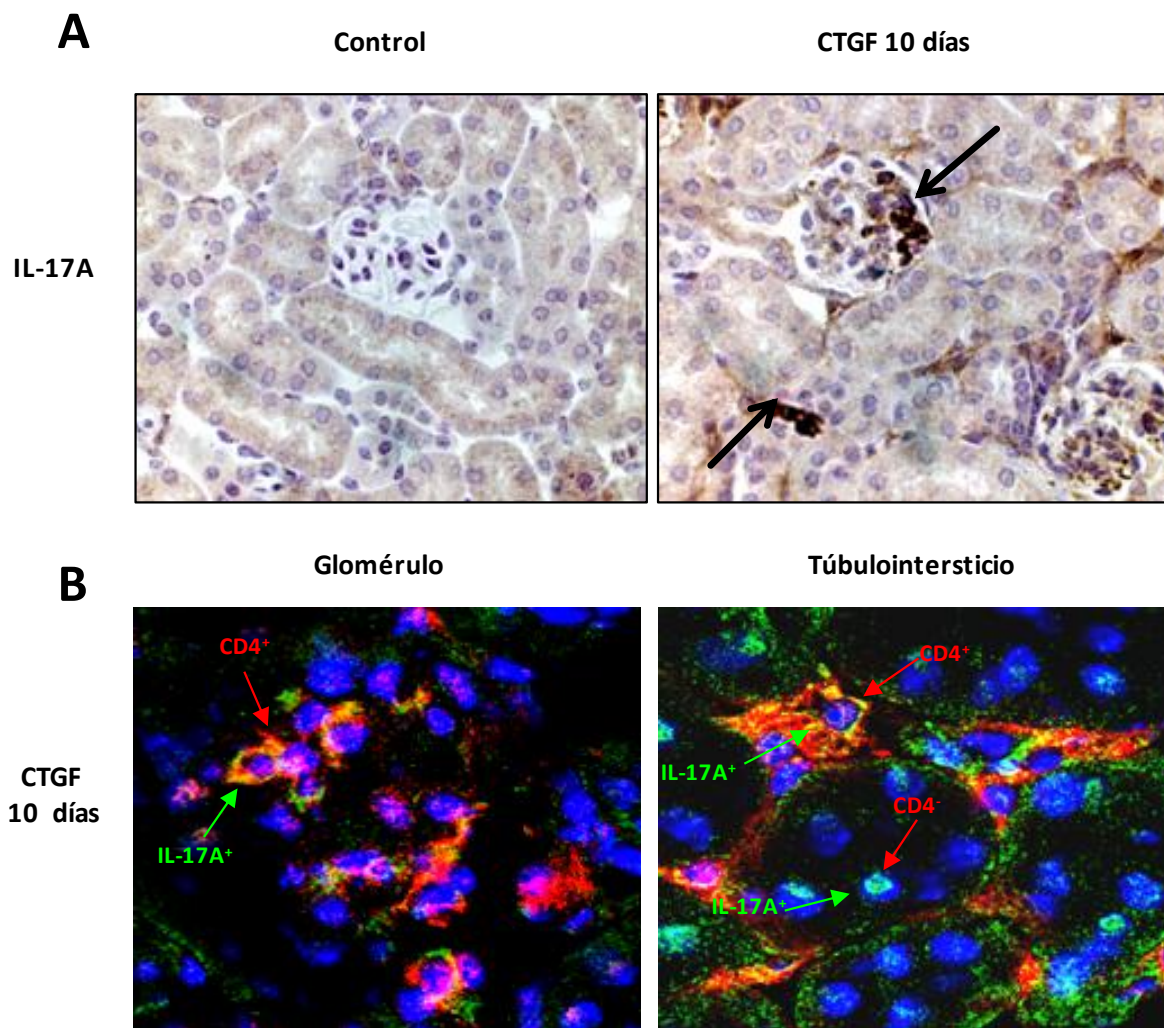
**FIGURA 19.** Los niveles de IL-17A, la citoquina clave de la respuesta Th17, aumentaron en el riñón de ratones tratados con CTGF. Mediante ELISA analizamos los niveles de proteínas renales de los ratones inyectados con CTGF a los días 5, 10 y 15 y de los ratones control. La figura muestra los niveles de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17 expresados como media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo normalizados frente al control. \*  $p < 0.05$  vs. control.

Por PCR confirmamos que en los ratones tratados con CTGF se producía un aumento significativo de los niveles de ARNm de IL-17A a todos los tiempos estudiados comparados con los controles (figura 20A). En los animales tratados con CTGF a 10 días, donde se había observado un nivel máximo de producción renal de IL-17A, realizamos estudios más exhaustivos para confirmar la activación de la respuesta Th17. Mediante western blot se confirmó el aumento de los niveles proteicos de IL-17A en el riñón causado por CTGF (figura 20B).



**FIGURA 20.** CTGF aumentó los niveles renales de IL-17A a los 10 días. La figura A muestra la expresión génica renal de IL-17A evaluada por PCR a tiempo real. B. Los niveles proteicos de IL-17A se valoraron por WB. La figura muestra en la parte inferior un gel representativo y en la parte superior el análisis densitométrico. Como control de carga se empleó GAPDH. Los resultados se normalizaron frente al control y se expresan como media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs. control.

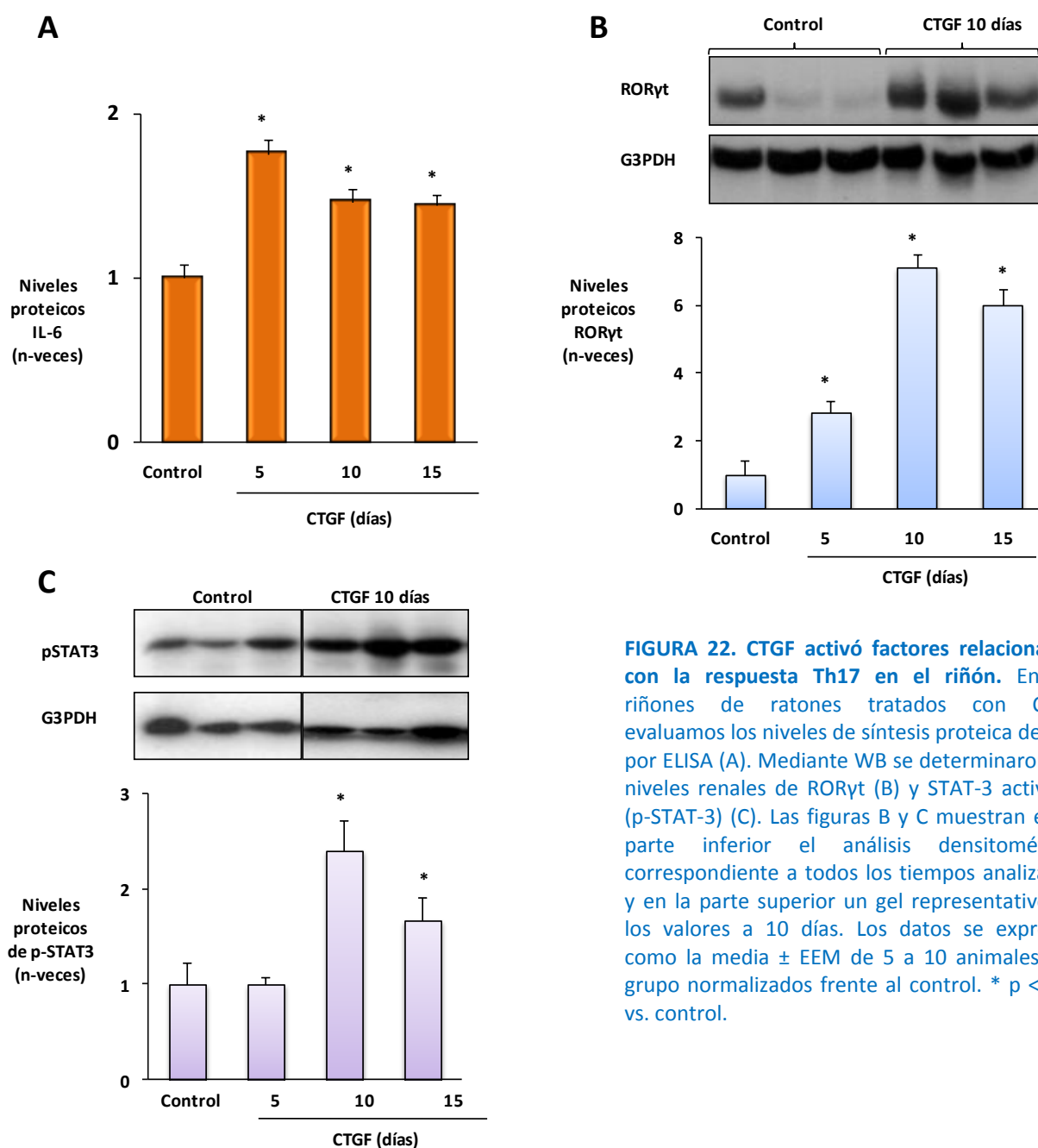
Para determinar la localización de las células que expresaban IL-17A realizamos estudios inmunohistoquímicos en secciones renales. En los ratones tratados con CTGF a 10 días observamos una tinción positiva frente a IL-17A en la zona intersticial y en algunas áreas glomerulares, mientras que no se observó tinción en los animales control (figura 21A). Para investigar la presencia de células Th17 realizamos una doble inmunotinción para localizar linfocitos Th ( $CD4^+$ ) productores de IL-17A. La administración de CTGF indujo la presencia de células con tinción doble positiva ( $CD4/IL17A$ ), que se corresponderían con células Th17 en el glomérulo y el área intersticial (figura 21B). Además, en el túbulo, observamos células positivas únicamente para IL-17A ( $CD4^-$ ) que correspondían con células túbuloepiteliales (figura 21B). Lo que indica que, en el riñón, además de las células Th17, existen otras células capaces de producir IL-17A.



**FIGURA 21. La administración de CTGF *in vivo* indujo la presencia de células Th17 en el riñón.** Mediante inmunohistoquímica determinamos la presencia de células IL-17A<sup>+</sup>. La figura A muestra una imagen representativa de una sección renal de un ratón control y uno tratado con CTGF a 10 días (400x). Las flechas indican las células con tinción positiva para IL-17A. Mediante inmunofluorescencia determinamos la presencia células doble positivas ( $CD4^+$  (rojo) IL17<sup>+</sup> (verde)) que corresponderían con linfocitos Th17. La figura B muestra una imagen representativa del análisis confocal (600x) donde se observa la presencia de células dobles positivas en los glomérulos y en áreas intersticiales (flechas). También se localizaron células  $CD4^-$ , IL-17A<sup>+</sup> en el túbulo. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

### 1.4.2. CTGF ACTIVA FACTORES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA TH17 EN EL RIÑÓN.

La diferenciación de las células Th17 está regulada por la citoquina IL-6 (Das J 2009) y por la activación de los factores de transcripción ROR $\gamma$ t y STAT-3 (Ivanov II 2006, Chaudhry A 2009). En los ratones tratados con CTGF los niveles renales de IL-6, determinados por ELISA, y de ROR $\gamma$ t, analizados mediante WB, estaban aumentados significativamente a todos los tiempos comparados con los controles (figura 22 A y B). En estos ratones los niveles de STAT-3 fosforilado estaban significativamente elevados a los 10 y 15 días indicando una activación de STAT-3 en respuesta al tratamiento con CTGF (Figura 22C). Estos resultados demuestran que CTGF activa, localmente, mecanismos moleculares que inducen la diferenciación de células Th17 en el riñón.

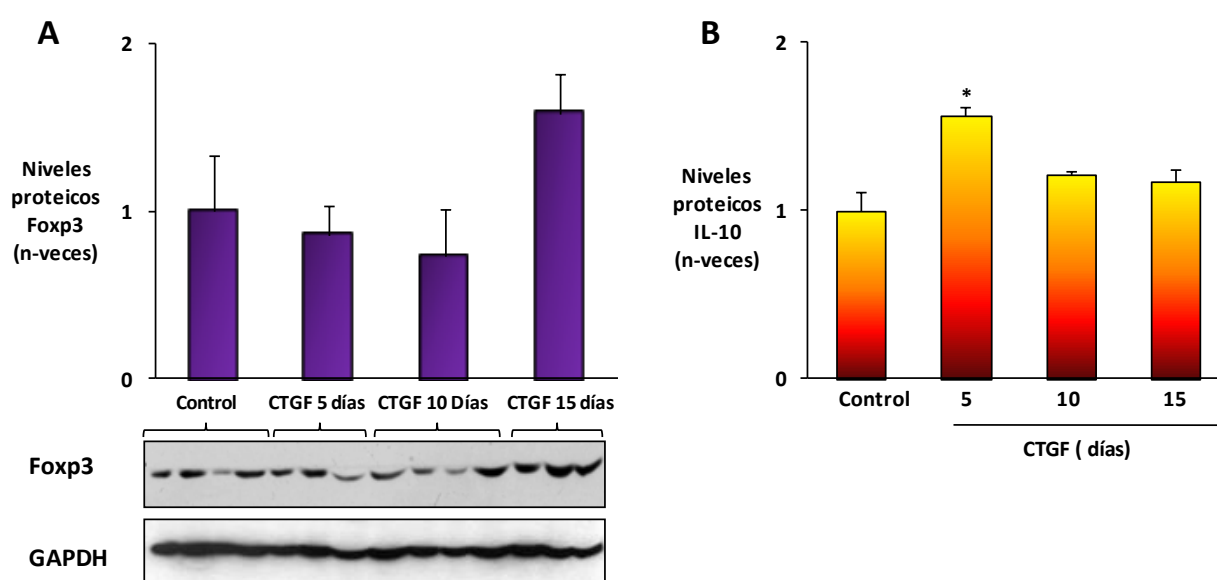


**FIGURA 22. CTGF activó factores relacionados con la respuesta Th17 en el riñón.** En los riñones de ratones tratados con CTGF evaluamos los niveles de síntesis proteica de IL-6 por ELISA (A). Mediante WB se determinaron los niveles renales de ROR $\gamma$ t (B) y STAT-3 activado (p-STAT-3) (C). Las figuras B y C muestran en la parte inferior el análisis densitométrico correspondiente a todos los tiempos analizados y en la parte superior un gel representativo de los valores a 10 días. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo normalizados frente al control. \*  $p < 0.05$  vs. control.

### 1.4.3. CTGF NO INDUCE ACTIVACIÓN RENAL DE FACTORES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA

#### Treg.

Debido a la estrecha relación entre la respuesta Th17 y la respuesta Treg (Bettelli E 2006, Mangan 2006, Weaver CT 2009, Mucida D 2007, Zhou L 2008) quisimos evaluar los niveles de factores relacionados con la respuesta Treg. Las células Treg se caracterizan por expresar el factor de transcripción Foxp3 (Huehn J 2004, Sakaguchi S 2005, Fontenot JD 2005) y la citoquina IL-10 (Sakaguchi S 2006). A nivel renal, los ratones tratados con CTGF no presentaron un aumento significativo de Foxp3 a ninguno de los tiempos estudiados (figura 23A). Los niveles proteicos de IL-10 en el riñón aumentaron de forma significativa a 5 días y regresaron a los niveles basales a partir del día 10 (figura 23B). Estos datos coinciden con los resultados descritos en el apartado 1.3 de esta sección; donde no se observaba aumento de TGF- $\beta$ 1, un inductor clave en la respuesta Treg, indicando que a nivel renal CTGF no actúa sobre esta respuesta.



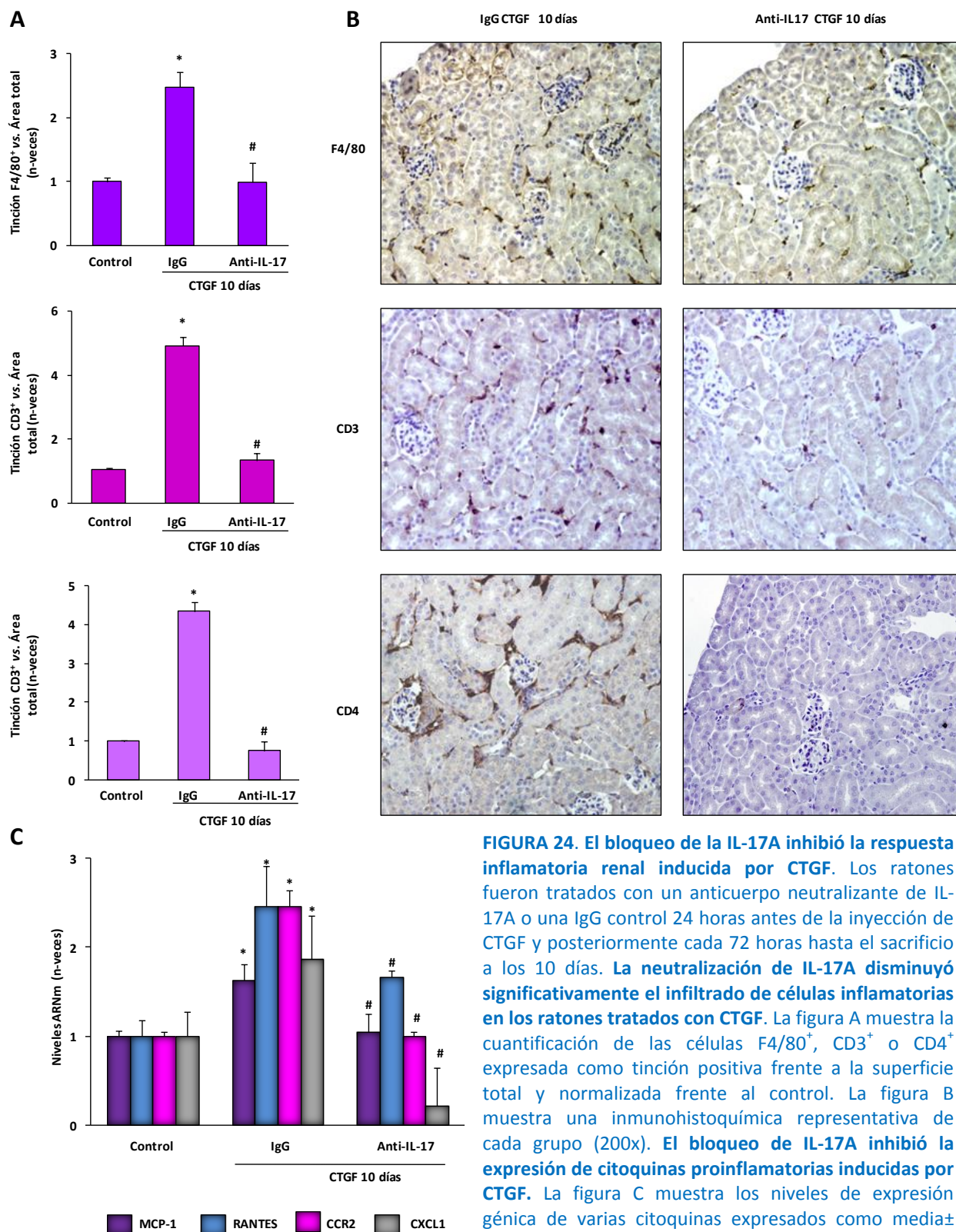
**FIGURA 23. CTGF no activa los factores relacionados con la respuesta Treg en el riñón.** Los niveles proteicos de Foxp 3 se determinaron por western blot (A) y los de IL-10 por ELISA. La figura A muestra en la parte inferior un gel representativo y en la parte superior el correspondiente análisis densitométrico. La figura B muestra los niveles de síntesis proteica de IL-10. Los resultados se normalizaron frente al control y se expresan como valor de la media  $\pm$  EEM de 5-10 animales por grupo.

### 1.5. EL BLOQUEO DE IL-17A INHIBE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR CTGF EN EL RIÑÓN.

Para investigar si la respuesta Th 17 era la responsable de la inflamación renal a largo plazo causada por CTGF bloqueamos esta respuesta mediante el empleo de un anticuerpo neutralizante de IL-17A, la citoquina efectora de la respuesta Th17. El diseño del modelo se realizó según se detalla en el apartado (1.1.1) de materiales y métodos. Brevemente, los ratones fueron tratados con un anticuerpo frente a IL-17A 24 horas antes de la administración de CTGF y posteriormente cada 72 horas hasta su sacrificio a 10 días, por ser el tiempo donde se había observado un nivel máximo de producción renal de IL-17A. Como control se inyectaron los ratones con una inmunoglobulina G (IgG) del mismo isotipo que la del



anticuerpo. El bloqueo de IL-17A redujo la respuesta inflamatoria inducida por CTGF, como se observó por una disminución del infiltrado inflamatorio renal de macrófagos y linfocitos (figura 24 A y B) y por una reducción en la expresión renal de quimioquinas proinflamatorias (figura 24C). Esto datos demuestran la implicación de la respuesta Th17, y de su citoquina efectora IL-17A en el daño renal mediado por CTGF.



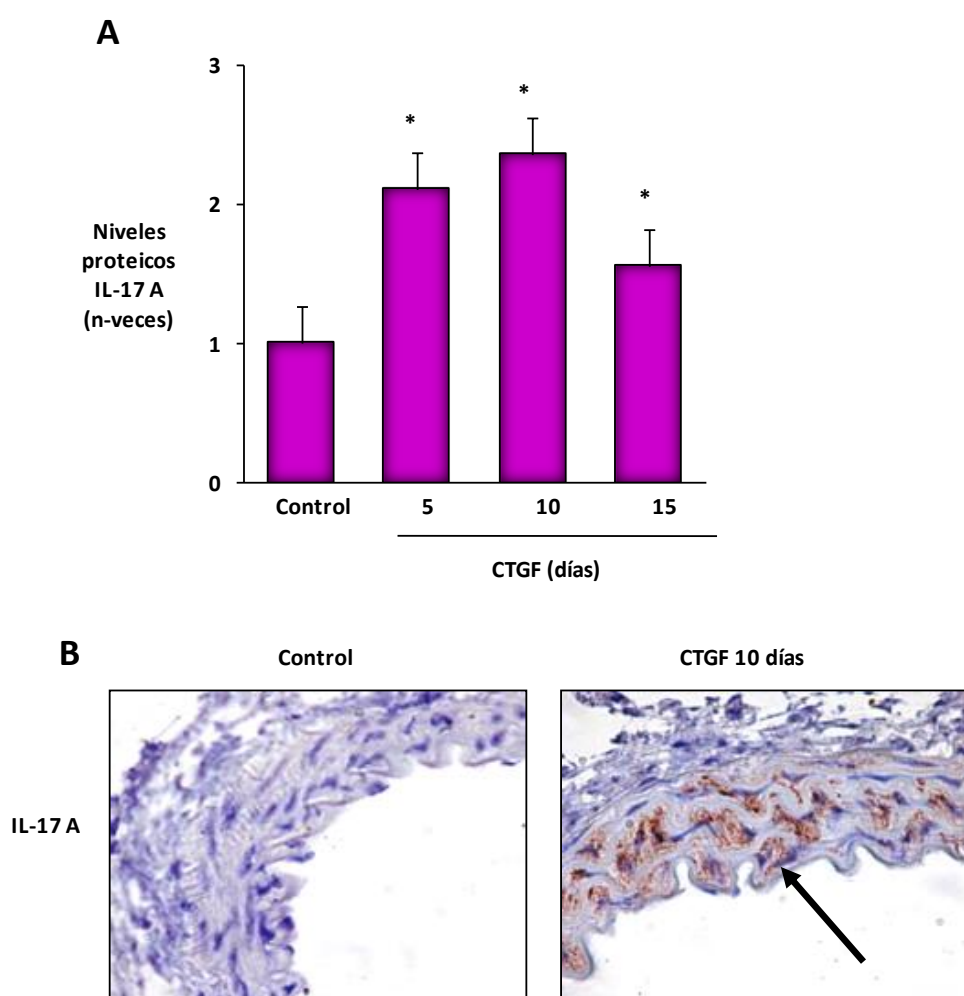


### 1.6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE CTGF AORTA.

Existen diversos mecanismos que afectan al sistema renal y al cardiovascular. La expresión de CTGF se encuentra aumentada tanto en patología renal como en múltiples patologías vasculares. Además, en los últimos años también se ha descrito la participación de IL-17A en varios modelos experimentales de daño vascular. Uno de los objetivos de esta tesis ha sido determinar el papel de CTGF en la respuesta inflamatoria en aorta y en particular con la respuesta mediada por IL-17A.

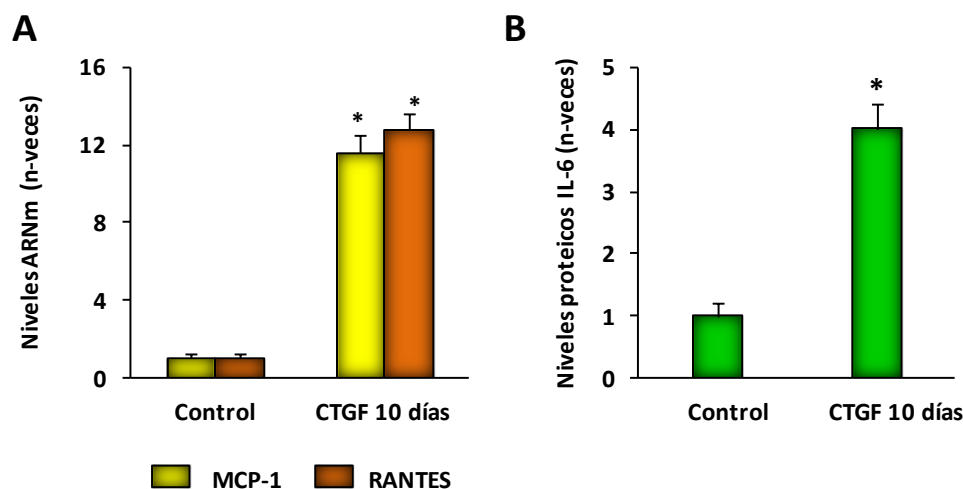
#### 1.6.1. CTGF INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA TH17 EN AORTA.

En tejido obtenido de muestras de aorta, los niveles de IL-17A estaban significativamente elevados en los ratones tratados con CTGF, a todos los tiempos de estudiados comparados con los controles (figura 25). El análisis inmunohistoquímico de aorta de ratones tratados con CTGF reveló células con una tinción positivas para IL-17A, que se correspondían con CMLVs, mientras que los controles presentaban una tinción negativa (figura 25B).



**FIGURA 25. La administración sistémica de CTGF en ratones aumentó los niveles de IL-17A en aorta.** En las aortas de ratones tratados con CTGF (2.5ng/gr peso de ratón) sacrificados a 5, 10 y 15 días se determinó la presencia de IL-17A. La figura A muestra la cuantificación como la media como  $\pm$  EEM de 5 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs. control. La figura B muestra una inmunotinción de secciones de aorta donde se observa tinción positiva para IL-17A de ratones inyectados con CTGF, principalmente en CMLV (flecha) (400x).

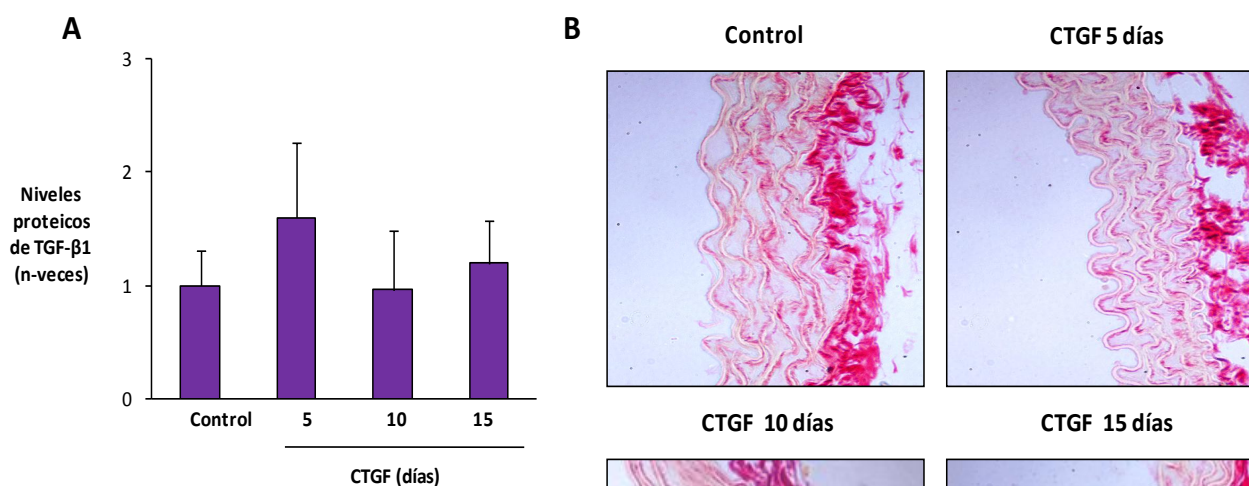
En las muestras de aorta analizamos la presencia de marcadores inflamatorios. En los ratones tratados con CTGF observamos un aumento significativo de la expresión génica de MCP-1 y RANTES y de la expresión proteica de IL-6 comparado con los controles (figura26).



**FIGURA 26. CTGF aumentó la expresión de quimioquinas proinflamatorias** En las muestras aorta de ratones tratados con CTGF evaluamos los niveles de expresión génica de MCP-1 y RANTES por PCR en tiempo real (A) y los niveles de proteína de IL-6 y TGF- $\beta$  por ELISA (B). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo normalizados frente al control. \* p < 0.05 vs. Control.

### 1.6.2. CTGF NO INDUCE UNA RESPUESTA FIBRÓTICA AÓRTICA.

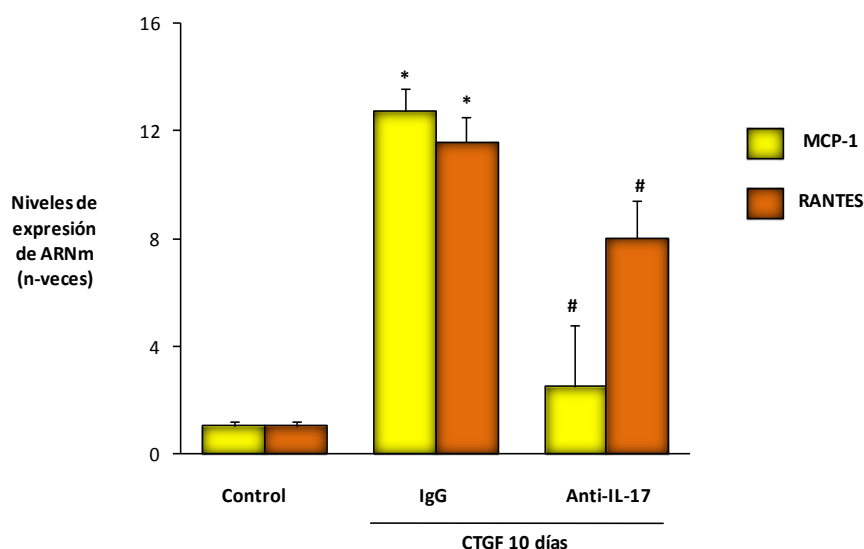
De forma análoga a lo que ocurría a nivel renal, no se observó aumento de TGF $\beta$ -1 (Figura27A) ni fibrosis vascular a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 27B).



**FIGURA 27. La administración de CTGF no indujo fibrosis en aorta.** En las muestras aorta de ratones tratados con CTGF evaluamos los niveles de expresión génica proteica de TGF- $\beta$ 1 por ELISA (A). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo normalizados frente al control. \* p < 0.05 vs. Control. La presencia de depósitos de colágeno se evaluó por tinción de rojo sirio. La figura B muestra una micrografía representativa de cada grupo de 5-10 animales analizados (200x).

### 1.7. EL BLOQUEO DE IL-17A INHIBE EL AUMENTO DE FACTORES PROINFLAMATORIOS INDUCIDOS POR CTGF EN AORTA.

La inhibición de la respuesta Th17, mediante el bloqueo de su citoquina efectora, IL17A, con un anticuerpo neutralizante disminuyó los niveles de citoquinas inflamatorias inducidas con CTGF (figura 28). Estos datos confirman participación de CTGF en la activación de la respuesta Th 17 no solo a nivel renal sino también en el tejido vascular.

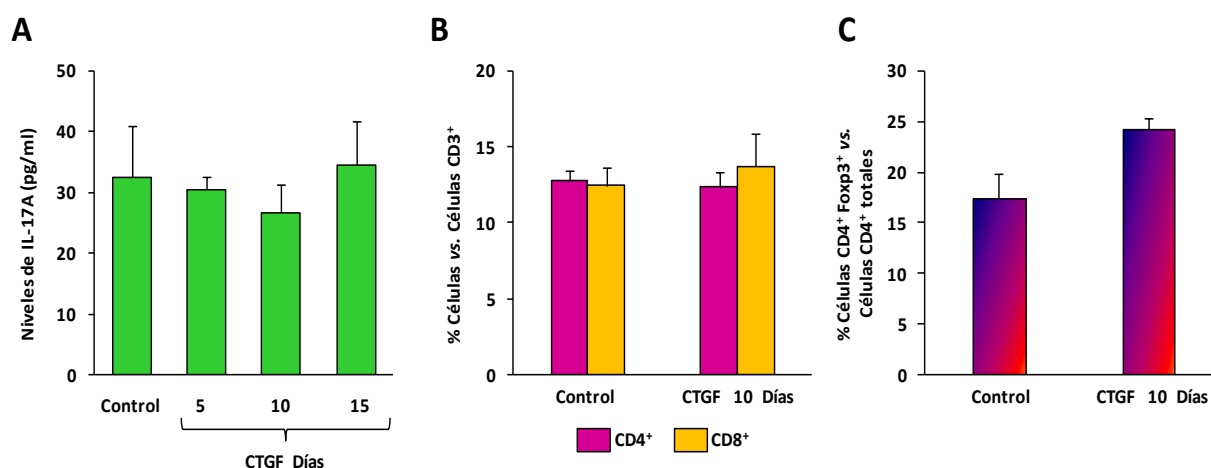


**FIGURA 28. El bloqueo de IL-17A inhibió la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por CTGF en aorta.** Los ratones fueron tratados con un anticuerpo neutralizante de IL-17A o una IgG control 24 horas antes de la inyección de CTGF y posteriormente cada 72 horas hasta el sacrificio a los 10 días. La figura muestra los niveles de expresión génica de MCP-1 y RANTES analizados por PCR a tiempo Real y expresados como la media  $\pm$  EEM de la cuantificación normalizada respecto al control. \*p < 0.05 vs. control, #p < 0.05 vs. CTGF-IgG.

### 1.8. CTGF NO REGULA LA RESPUESTA TH17/TREG PERIFÉRICA.

Por último, quisimos investigar si la administración de CTGF tenía un efecto sistémico, para ello evaluamos diferentes parámetros relacionados con la respuesta inflamatoria en sangre.

Para evaluar la respuesta Th17 sistémica analizamos los niveles de IL-17A en plasma, mediante ELISA y observamos que no existían diferencias significativas entre de los ratones tratados con CTGF y los de los controles (figura 29 A). En el plasma de ratones tratados con CTGF y ratones control valoramos la presencia de células inflamatorias. Por citometría de flujo comprobamos que el porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> (Th) y CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) era similar en ambos grupos (figura 29 B). Estos resultados muestran que CTGF no induce una expansión sistémica de las células Th17, lo que indicaría que la respuesta inducida por CTGF es de tipo local, con tejidos diana como el riñón y la aorta. Además de evaluar la respuesta Th17 quisimos determinar el efecto de CTGF en las células Treg. Mediante citometría de flujo evaluamos los niveles circulantes de CD4<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> (Treg) y observamos que CTGF tampoco era capaz de modificar los niveles de estas células en sangre (figura 29 C).



**FIGURA 29. CTGF no reguló la respuestas Th17/Treg en sangre. La administración de CTGF no afectó a los niveles de IL-17A sistémica.** La figura A muestra la cuantificación de los niveles de IL-17A analizados por ELISA y expresados como media  $\pm$  EEM en pg/ml de plasma de 10 animales por grupo. **CTGF no modifica el porcentaje de linfocitos Th (CD4<sup>+</sup>), T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) o Treg en sangre.** La figura B muestra la cuantificación, por citometría de flujo, expresado como % de linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> frente al número de linfocitos totales (CD3<sup>+</sup>). La figura C muestra la cuantificación del % de linfocitos CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Treg) frente al número de linfocitos CD4<sup>+</sup> totales. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM de 10 animales por grupo. En ninguno de los casos se observan

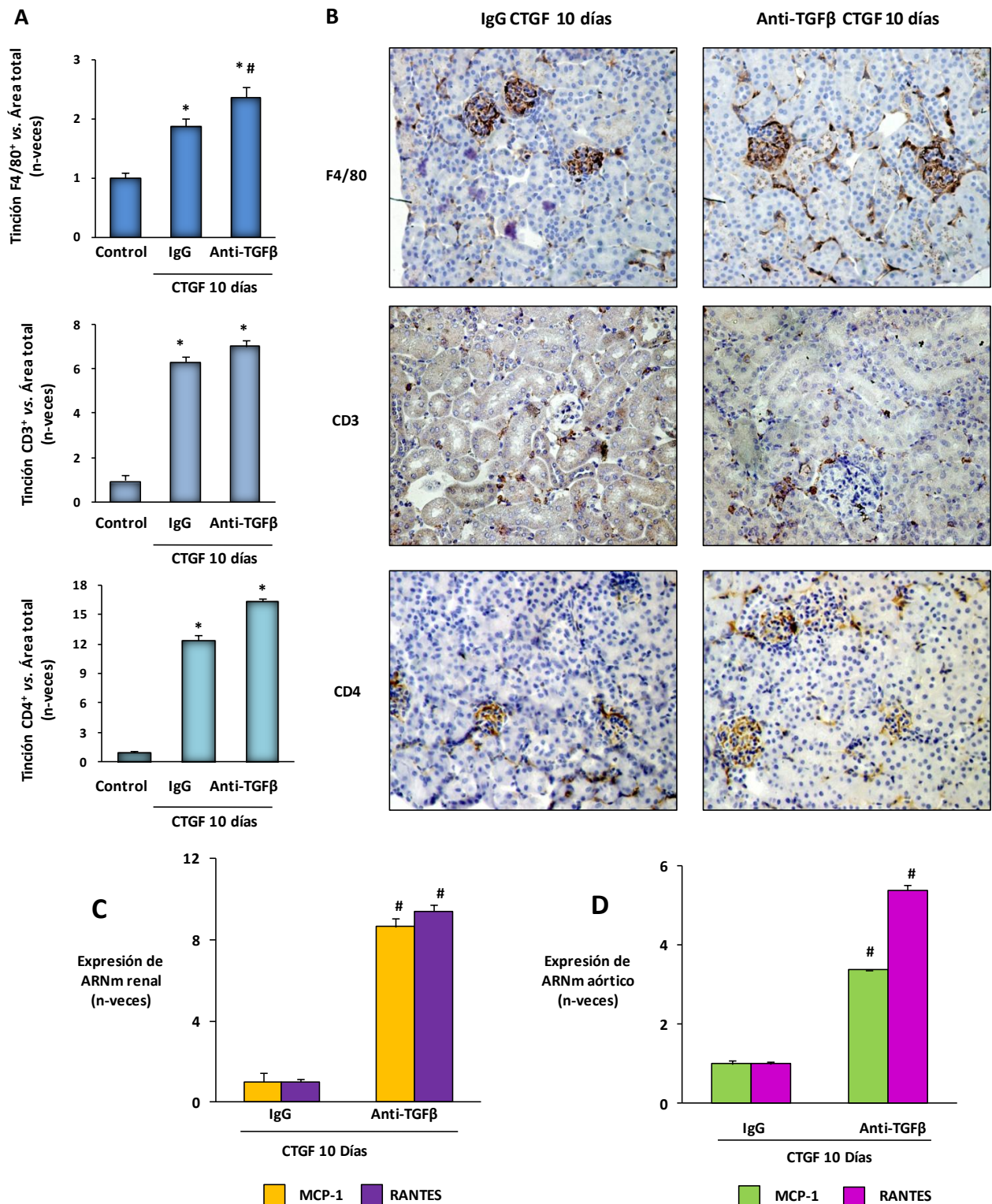
## 2. EFECTO DEL BLOQUEO DE TGF- $\beta$ EN LA RESPUESTA CAUSADA POR CTGF.

### 2.1. LA ADMINISTRACIÓN DE UN ANTICUERPO NEUTRALIZANTE DE TGF- $\beta$ ACTIVO AUMENTA LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR CTGF EN RIÑÓN Y AORTA.

Aunque existen numerosos estudios que describen a CTGF como un mediador o coactivador de la respuesta fibrótica inducida por TGF- $\beta$  (Grotendorst, 1997, Mori T 1999, Ruiz-Ortega M 2002 y 2007, Rodríguez-Vita J 2008), no existen apenas datos sobre el efecto directo de CTGF en la expresión-regulación de TGF- $\beta$ . Además nuestro grupo ha descrito que existen otros factores como Ang II capaces de activar CTGF independiente de TGF- $\beta$  (Rodríguez Díez R 2010, Sánchez-López E 2009b).

En los apartados 1.3 y 1.6 de resultados se muestra que la inyección de CTGF en ratones no induce un aumento sostenido de la expresión génica de TGF- $\beta$ 1 ni la síntesis de TGF- $\beta$  activo a nivel renal o vascular (figuras 17 y 26). Para profundizar en la relación entre CTGF/TGF- $\beta$  en la progresión del daño tisular hemos investigado el efecto del bloqueo de TGF- $\beta$  en la respuesta inducida por CTGF. El modelo experimental se realizó como se detalla en métodos (1.1.1). La inhibición de TGF- $\beta$  activo aumentó la respuesta inflamatoria renal inducida por CTGF, incrementando de forma significativa el número de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) por encima de los valores inducidos por CTGF (figura 30 A y B) y no redujo los niveles de linfocitos en el riñón en los ratones tratados con CTGF. Además, el bloqueo de TGF- $\beta$  aumentó significativamente los niveles génicos de las quimioquinas proinflamatorias MCP-1 y RANTES respecto de los ratones tratados únicamente con CTGF, tanto a nivel renal como en aorta (figura 30C).

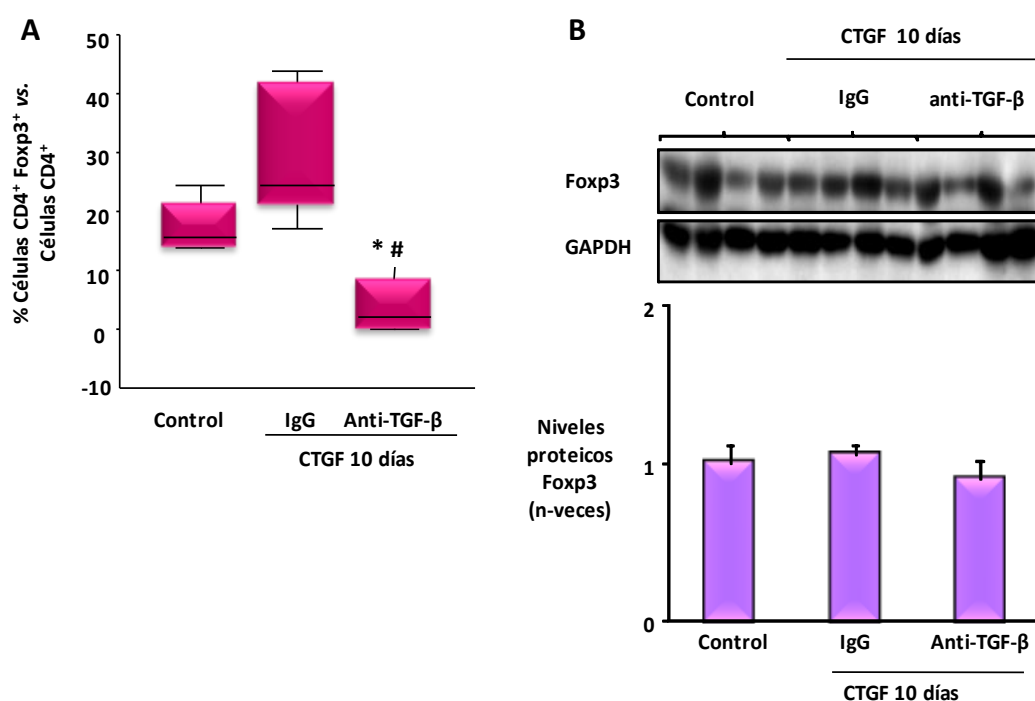




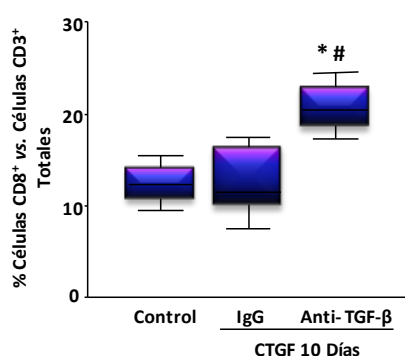
**FIGURA 30. El bloqueo de TGF- $\beta$  aumentó la respuesta inflamatoria inducida por CTGF.** Los ratones fueron tratados con un anticuerpo anti-TGF- $\beta$  o una IgG control 24 horas antes de la inyección de CTGF y posteriormente cada 72 horas hasta el sacrificio a los 10 días. **La neutralización de TGF- $\beta$  aumentó significativamente el infiltrado de macrófagos (F4/80 $^{+}$ ).** La figura A muestra la cuantificación de las células F4/80 $^{+}$ , CD3 $^{+}$  o CD4 $^{+}$  expresada como tinción positiva frente a la superficie total y normalizada frente al control. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de 5 a 10 animales por grupo. La figura B muestra una inmunohistoquímica representativa de cada grupo. (200x). **El bloqueo de TGF- $\beta$  aumentó la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por CTGF en riñón y aorta.** La figura muestra los niveles de ARNm renal (C) y aórtico (D) de MCP-1 y RANTES expresados como la media  $\pm$  EEM de la cuantificación normalizada respecto a la IgG control. \*p < 0.05 vs. control, #p < 0.05 vs. CTGF-IgG.

## 2.2. LA INHIBICIÓN DE TGF- $\beta$ DISMINUYE EL NÚMERO DE CÉLULAS TREG Y AUMENTA EL NÚMERO DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS CIRCULANTES.

Se ha descrito que TGF- $\beta$  actúa como factor antiinflamatorio ya que está implicado en la diferenciación de células Treg a través de la activación de Foxp3 (Zheng SG 2002, Chen W 2003). Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si el efecto del bloqueo de TGF- $\beta$  sobre la respuesta inflamatoria podría deberse a una desregulación de las células Treg. Mediante citometría de flujo analizamos el número de células circulantes en el plasma de ratones. El tratamiento con el anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$  disminuyó significativamente el porcentaje de células Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) en los ratones tratados con CTGF (figura 31A). Sin embargo, a nivel local la neutralización con TGF- $\beta$  no modificó los niveles proteicos de Foxp3 (figura 31B) ni de IL-17A en el riñón. Además, la inhibición de TGF- $\beta$  aumentó el número de linfocitos T citotóxicos circulantes en los ratones tratados con CTGF (Figura 32).



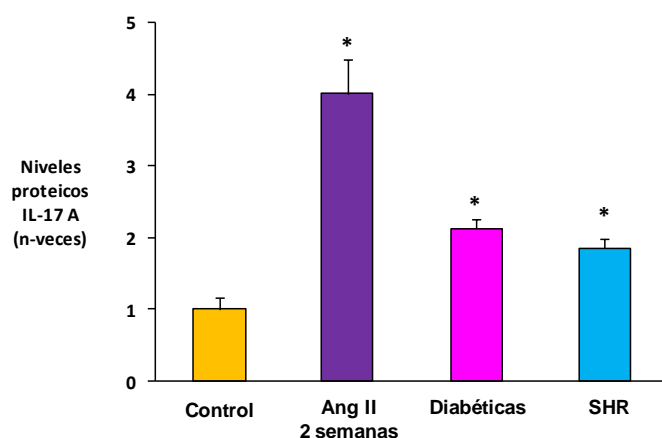
**FIGURA 31. Efecto del bloqueo de TGF  $\beta$  en los ratones tratados con CTGF. El bloqueo de TGF  $\beta$  disminuyó el porcentaje de células Treg en sangre.** La figura A muestra la cuantificación, por citometría de flujo, del número de células Treg (CD4<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>) en plasma expresada como % de células CD4<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> frente al número de CD4<sup>+</sup> totales. **El bloqueo de TGF  $\beta$  no modificó los niveles renales de Foxp3.** En muestras renales cuantificamos los niveles de Foxp3 mediante WB. La imagen B muestra en la parte superior un gel representativo y en el panel inferior el análisis densitométrico con los valores expresados como media  $\pm$  EEM de los valores normalizados frente al grupo control. \*p < 0.05 vs. control. #p < 0.05 vs. CTGF-IgG.



**FIGURA 32. El bloqueo de TGF- $\beta$  aumentó el número de linfocitos T citotóxicos.** Por citometría de flujo se cuantificó el número de células CD8<sup>+</sup> en plasma. La figura A muestra la cuantificación expresada como el % de linfocitos CD8<sup>+</sup> frente al número de linfocitos CD3<sup>+</sup> totales de 5-10 animales por grupo \*p < 0.05 vs. control, #p < 0.05 vs. CTGF-IgG.

### 3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE IL-17A EN OTROS MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO RENAL.

La mayoría de los datos sobre los efectos de IL-17A a nivel renal se han realizado en modelos experimentales de glomerulonefritis autoinmune (Turner E 2010). Uno de los objetos de esta tesis ha sido evaluar la presencia de IL-17A en modelos de daño renal no asociados a procesos autoinmunes, estudiando para ello los modelos experimentales de infusión de Angiotensina II, ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y nefropatía diabética inducida por estreptozotocina; ya que estos modelos reproducen las situaciones patologías humanas principales causantes de ERC (la diabetes, hipertensión arterial y activación del sistema renina angiotensina) (Mezzano SA 2005). Los modelos se realizaron como se detallan en el correspondiente apartado de métodos (1.2.1, 1.2.1, y 1.2.3). A los tiempos estudiados todos estos modelos se caracterizan por daño renal e infiltrado inflamatorio como se ha descrito previamente por nuestro grupo y otros autores (Ruiz Ortega M 2006, Carvajal G 2008). El análisis de los niveles de IL-17A en tejido renal mediante ELISA mostró que todos los modelos de daño renal analizados presentaban niveles significativamente elevados de IL-17A comparados con los controles (figura 34). Debido al alto coste de los anticuerpos neutralizantes de IL-17A ha resultado imposible realizar experimentos de inhibición de la respuesta en estos modelos.



**FIGURA 34. Evaluación de los niveles de IL-17A en modelos experimentales no inmunes de daño renal.** En riñones de rata sometidos a daño renal experimental (infusión de Ang II, diabetes, hipertensión) se evaluaron los niveles de IL-17A por ELISA. La figura muestra la cuantificación de los niveles renales de IL-17A (6 animales por grupo) expresados como media  $\pm$  EEM de los valores normalizados frente al grupo control. \*p < 0.05 vs. control.

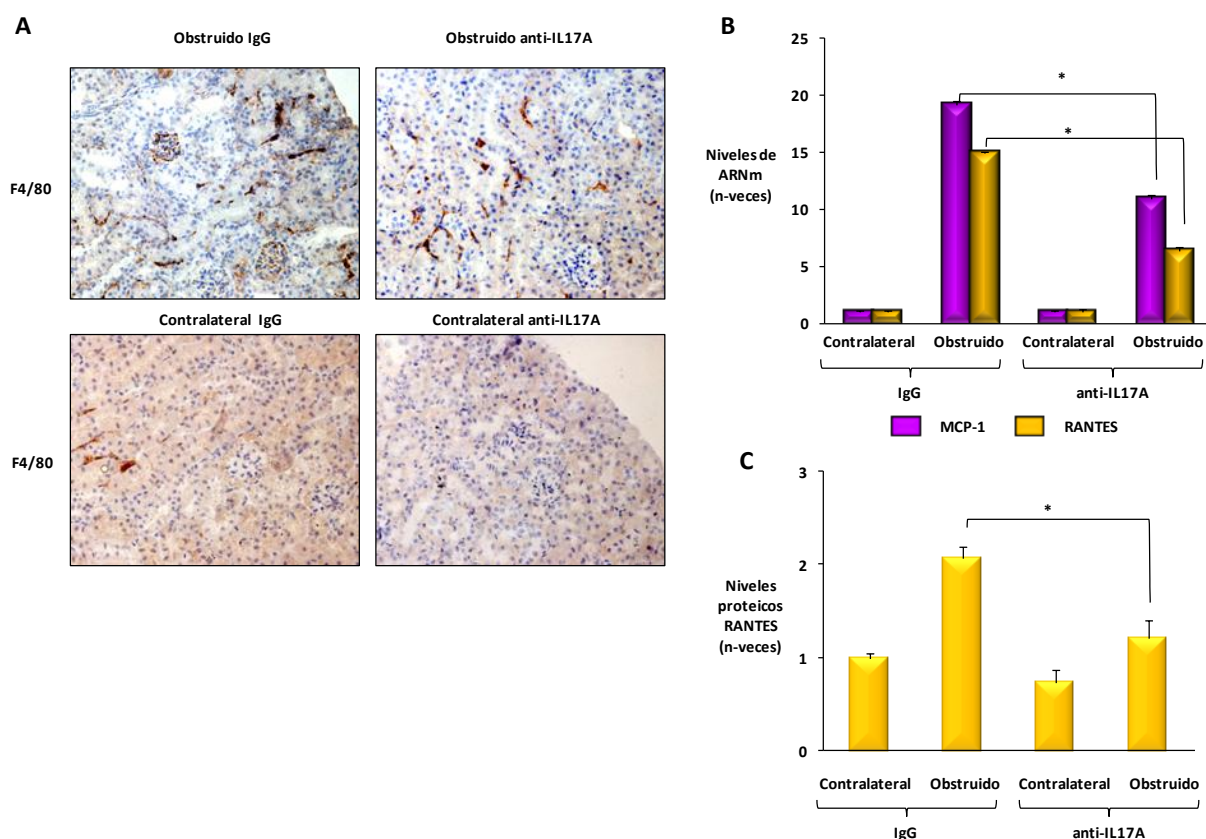
### 4. EFECTO DEL BLOQUEO DE LA RESPUESTA TH17 EN EL MODELO DE DAÑO RENAL POR OBSTRUCCIÓN UNILATERAL DEL URETER.

El modelo de UUO en ratón, es un modelo bien caracterizado que destaca por la presencia de infiltrado inflamatorio en la zona intersticial, que aparece a los 2 días, y desarrollo de fibrosis a partir del cuarto día. Además, este modelo genera estrés oxidativo, provoca apoptosis de las células tubulares y activación de diferentes vías de señalización, incluidas la vía de NF- $\kappa$ B (Esteban V 2004).

Un estudio previo ha demostrado la presencia de células Th17 en el riñón tras la obstrucción del uréter (Dong X 2008) sin embargo, la implicación de IL-17A en el daño renal en este modelo experimental

se desconoce. En este modelo realizamos un protocolo de neutralización de IL-17A según se detalla en el apartado (1.3) de material y métodos. 24 horas antes de la cirugía se administró a los ratones, vía intraperitoneal, un anticuerpo neutralizante de IL-17A o una IgG a modo de control. Los ratones se sacrificaron a los 3 días posteriores al UUO.

La valoración del infiltrado inflamatorio intersticial en los riñones obstruidos mostró que los ratones tratados con el anticuerpo frente a IL-17A presentaban un menor número de macrófagos que los tratados con la IgG control (figura 35A). El bloqueo de IL-17A disminuyó la expresión génica de MCP-1 (figura 35B) y los niveles de expresión génica y proteica de RANTES en los riñones obstruidos comparado con los tratados con IgG control (figura 35 B y C).

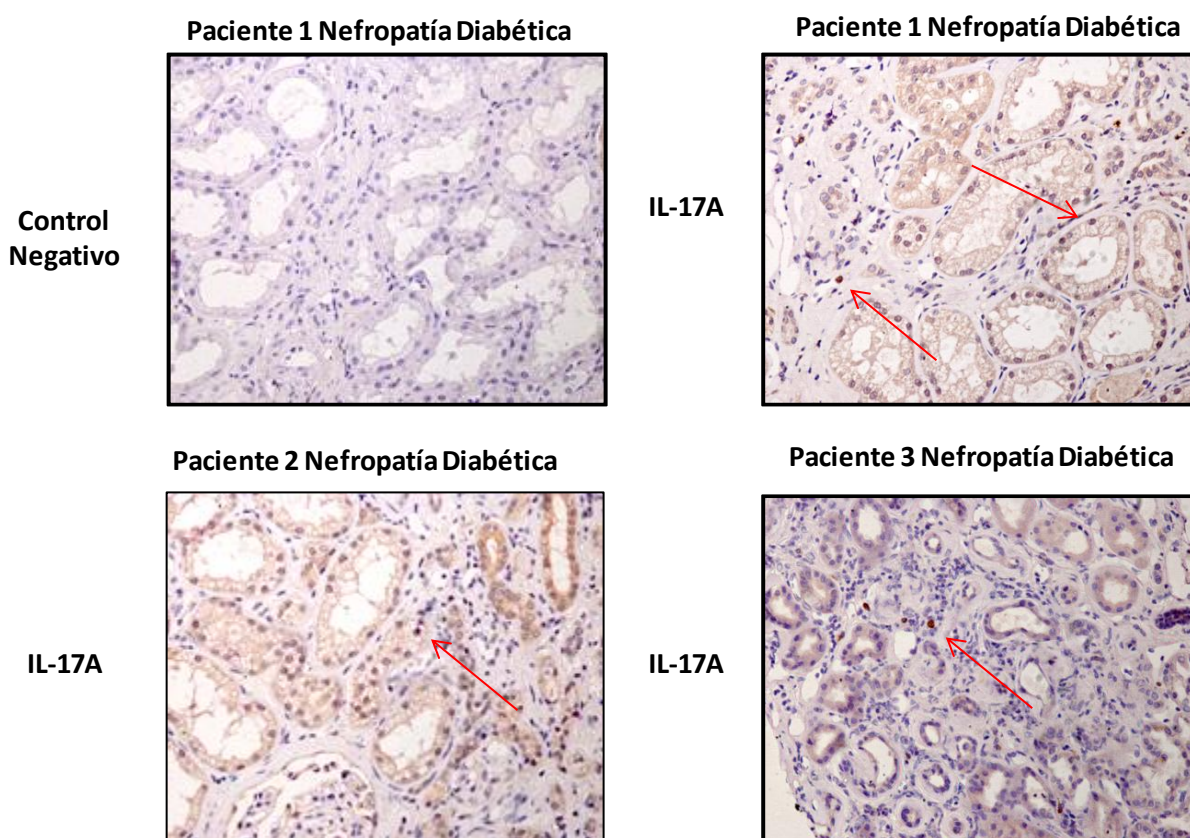


**FIGURA 35. El bloqueo de IL-17A inhibe la respuesta inflamatoria en el riñón obstruido de ratón.** Los ratones se trataron con un anticuerpo neutralizante de IL-17A o su correspondiente IgG control 24 horas antes del UUO y se sacrificaron a los 3 días (n= 5 animales por grupo). **La neutralización de IL-17A disminuyó significativamente el infiltrado de células inflamatorias en los ratones con UUO.** La figura A muestra una inmunohistoquímica de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) representativa de un riñón contralateral y un obstruido de cada grupo (200x). **El bloqueo de IL-17A inhibió la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por UUO** La figura B muestra los niveles de expresión génica de MCP-1 y RANTES determinada por PCR y la figura C los niveles proteicos de RANTES determinados por ELISA. Los resultados se muestran como media± EEM de la cuantificación normalizada respecto al riñón contralateral. \*p <0.05 vs. Obstruido/IgG control.



## 5. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA RESPUESTA TH17 EN PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA

En pacientes con nefritis lúpica y glomerulonefritis asociada a ANCA se ha descrito la presencia de IL-17A en riñón (Crispin JC 2008, Velden J 2012), sin embargo no hay datos en nefropatías humanas de origen no inmune. Una de las principales causas de ERC es la diabetes (Mezzano SA 2005) por lo que nuestro siguiente objetivo ha sido determinar la existencia de una activación local de la respuesta Th17 en la nefropatía diabética humana. En biopsias renales de pacientes con nefropatía diabética observamos una tinción positiva para IL-17A en varios tipos celulares, incluidas células túbuloepiteliales (figura 33).



**FIGURA 33. Presencia de células IL-17A positivas en biopsias renales de pacientes con nefropatía diabética.** La figura en el panel derecho una micrografía representativa de varios pacientes con nefropatía diabética, de 6 analizados donde se observan células IL-17A<sup>+</sup>. En el panel superior izquierdo se muestra un control negativo de la técnica.

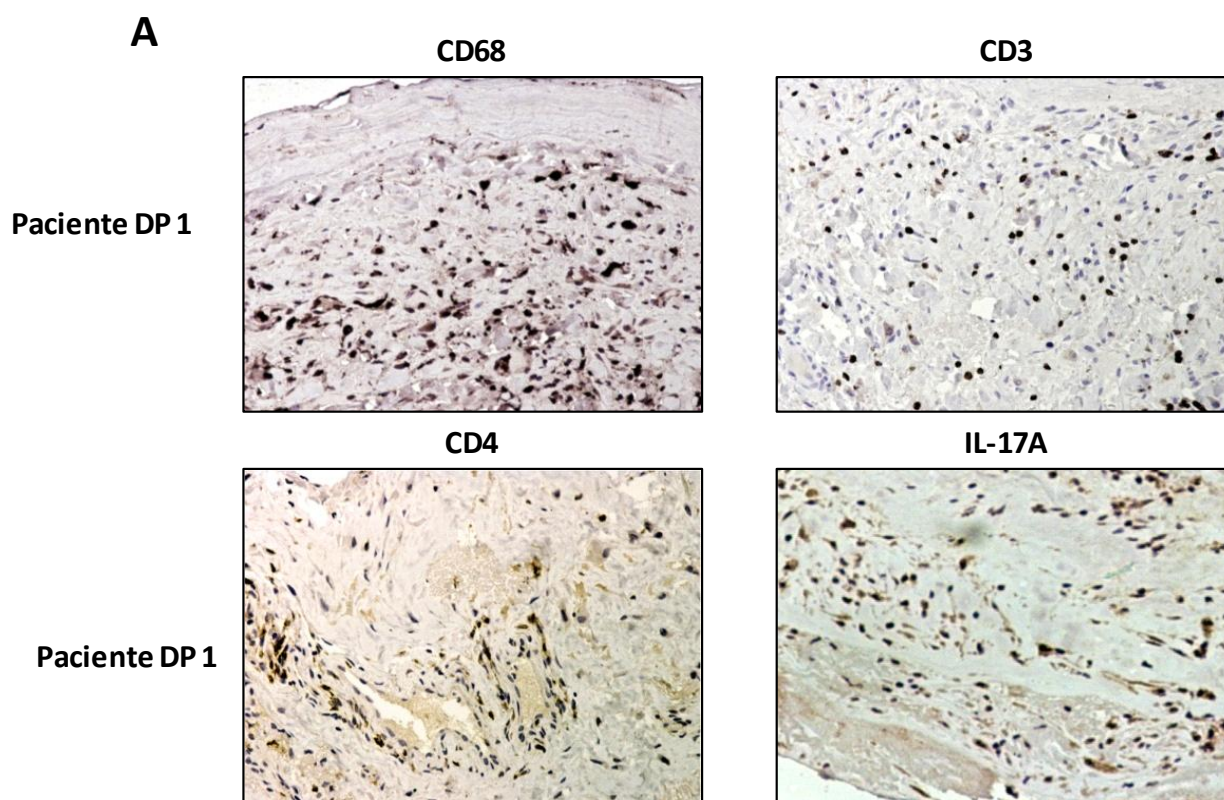
## 6. PAPEL DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA TH17 EN EL PERITONEO.

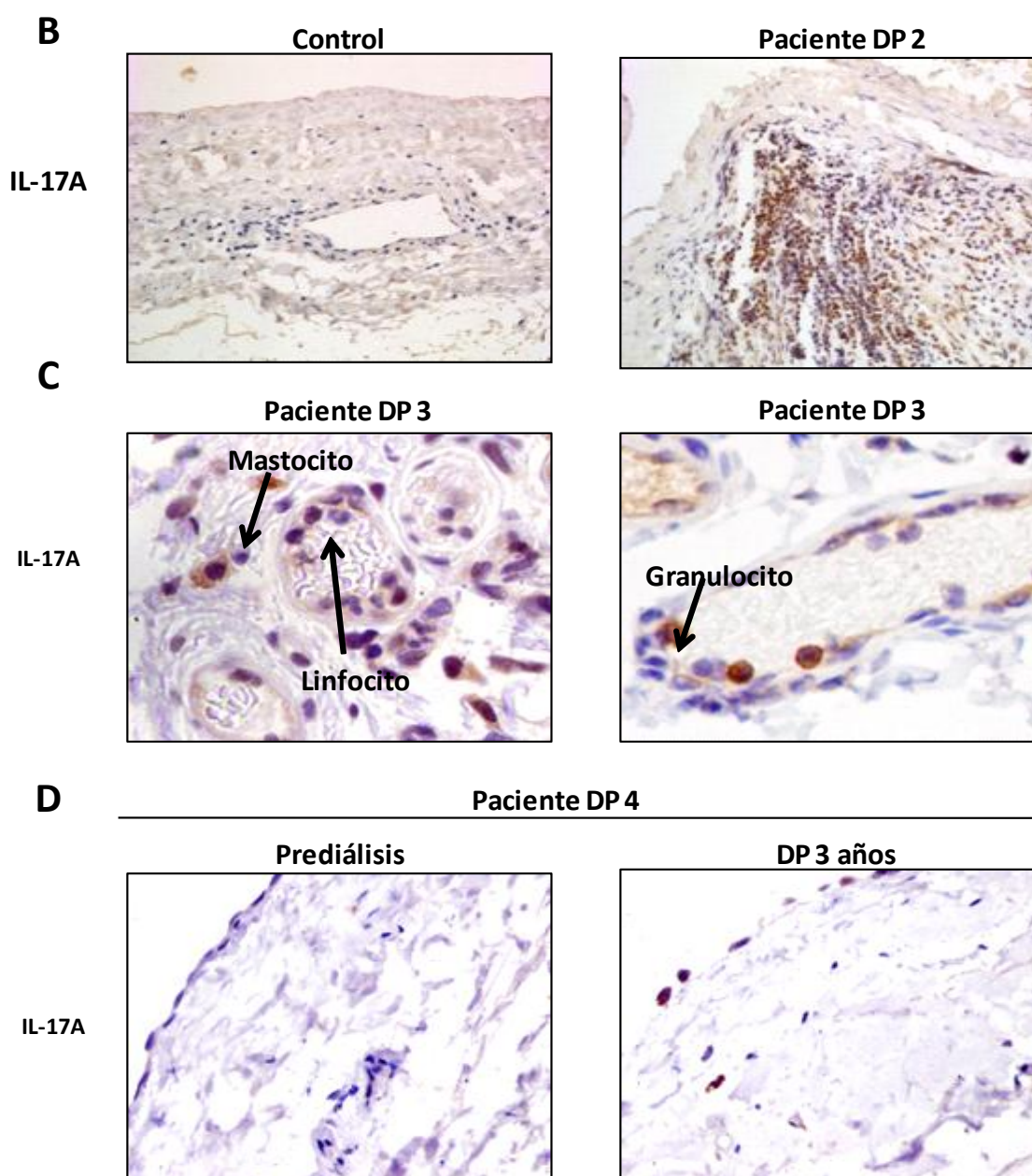
### 6.1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA TH17 EN PACIENTES EN DIÁLISIS PERITONEAL

#### 6.1.1. PRESENCIA DE CÉLULAS IL-17A POSITIVAS EN BIOPSIAS PERITONEALES.

En pacientes sometidos a diálisis peritoneal (DP) se ha descrito la existencia de una inflamación crónica y un desequilibrio del balance Th1/Th2, pero no hay datos acerca de la respuesta Th17 (Zamauskaite A 1999, Libetta C 2011, Roberts GW 2009). El objetivo de esta tesis ha sido evaluar el estado de la respuesta Th17, en concreto los niveles de IL-17A en biopsias peritoneales y en el efluente de pacientes en diálisis peritoneal.

En las biopsias peritoneales de pacientes en DP observamos un elevado infiltrado inflamatorio, caracterizado por la presencia de células inflamatorias de tipo macrófago ( $CD68^+$ ), linfocitos T ( $CD3^+$ ) y linfocitos Th ( $CD4^+$ ) (figura 36A). Estos pacientes presentaban además un elevado número de células IL-17A<sup>+</sup> (figura 36 A y B), mientras que en biopsias de donantes sin daño en el peritoneo se observaba una tinción negativa (figura 36 B). Además de linfocitos, también se observaron otras células positivas para IL-17A que correspondían por su morfología con mastocitos y granulocitos (figura 36 C), confirmando el hecho de que las células Th17 no son la única fuente de IL-17A (Miossec P 2009). En biopsias consecutivas del mismo paciente, obtenidas una en la etapa prediálisis y otra tres años después, se observó que la muestra prediálisis mostraba una tinción negativa para IL-17A y la aparición de células IL-17A positivas en la muestra tomada tras la diálisis (figura 36 D). Esta presencia de células IL-17A positivas estaba asociado a una pérdida de la capa mesotelial, como se observa en la figura 36 D.





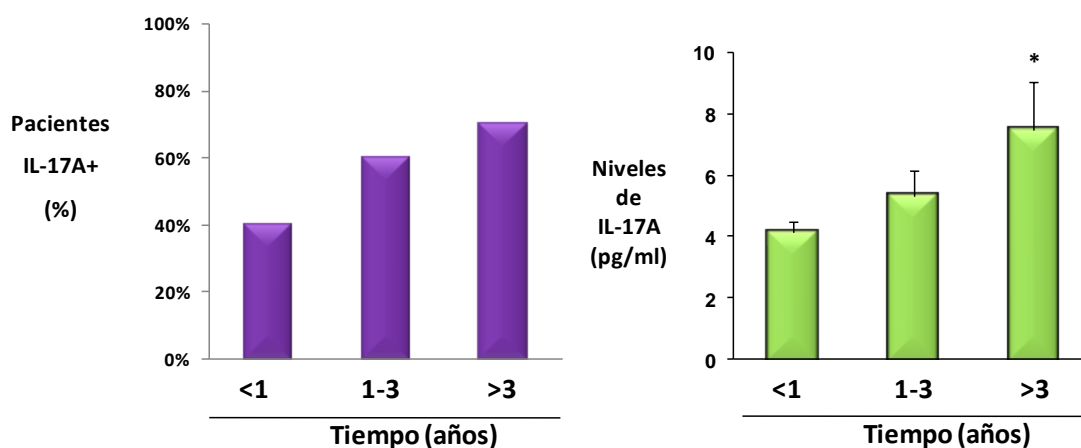
**FIGURA 36. Presencia de células IL-17A positivas en biopsias peritoneales.** En biopsias de pacientes en DP se valoró el infiltrado inflamatorio y el número de células IL-17A<sup>+</sup>. La figura A muestra distintas micrografías de un paciente con peritonitis esclerosante donde se observó un elevado infiltrado de macrófagos (CD68<sup>+</sup>) linfocitos (CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>) y células IL-17A<sup>+</sup>. La figura B muestra un ejemplo representativo de un paciente con peritonitis en el panel derecho y un control sin daño peritoneal en el izquierdo (100x). La figura C muestra dos micrografías en detalle de un paciente en DP donde se observaron células IL-17A<sup>+</sup> con distinta morfología, las flechas indican cada tipo celular (600x). La figura D muestra dos biopsias del mismo paciente tomadas prediálisis (izquierda) y tras tres años en DP (derecha) teñidas con IL-17A (200x).

### 6.1.2. LOS PACIENTES EN DIÁLISIS PERITONEAL PRESENTA NIVELES ELEVADOS DE IL-17A EN EL EFLUENTE.

La exposición de la membrana peritoneal a LD induce la migración de células inflamatorias a la cavidad peritoneal. Estas células pueden ser obtenidas por lavado peritoneal y son representativos de los procesos inflamatorios que suceden en el peritoneo (Aroeria LS 2007). En el efluente peritoneal obtenido de pacientes en DP analizamos, mediante ELISA, la presencia de IL-17A. Los pacientes se dividieron en 3



grupos dependiendo del tiempo que llevarán sometidos a diálisis peritoneal: grupo 1, pacientes que llevaban menos de un año en diálisis (<1), grupo 2 pacientes entre 1 y 3 años y grupo 3 pacientes con más de 3 años. En el efluente peritoneal de varios pacientes se detectó la presencia de IL-17A, apreciándose un mayor porcentaje de individuos positivos para IL17A en el grupo que llevaba más de 3 años en DP (figura 37A). También se observó una correlación entre los niveles de IL-17A con el tiempo de diálisis (figura 37B).



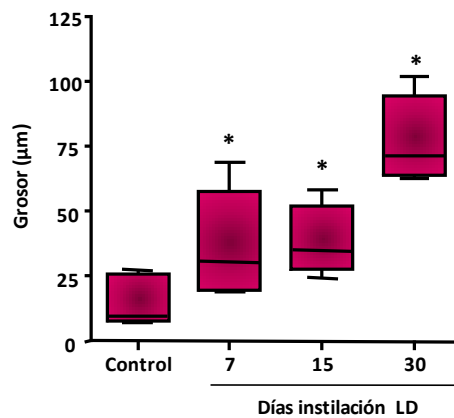
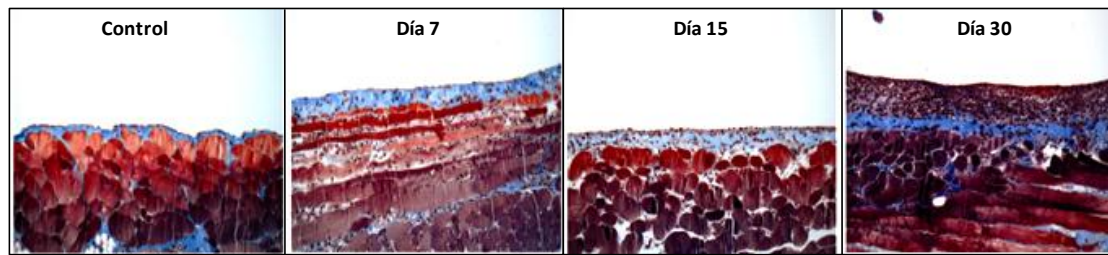
**FIGURA 37. Los pacientes en DP presentan un aumento significativo de IL-17A en el efluente en función del tiempo de diálisis.** En el efluente de pacientes en diálisis analizamos la concentración de IL-17A por ELISA. Los pacientes se dividieron en 3 grupos en función del tiempo de diálisis. La figura A muestra el número de pacientes (en %) que presentaban IL-17A en el efluente. La Figura B muestra la cuantificación de los niveles de IL-17A en pg/ml y expresados como la media  $\pm$  EEM de 10-12 pacientes por grupo. \* $p < 0.05$  vs. grupo <1.

## 6.2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA TH17 EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO PERITONEAL CAUSADO POR EXPOSICIÓN REITERADA A LÍQUIDO DE DIÁLISIS.

Nuestro objetivo ha sido estudiar la implicación de la respuesta Th17 en el daño causado en la membrana peritoneal por el proceso de diálisis peritoneal, utilizando para ello un modelo experimental murino de daño por exposición reiterada a líquido de diálisis (LD) (como se describe en métodos 1.4) que reproduce la situación en humanos. Como controles se utilizaron ratones operados (con catéter) pero no tratados con LD.

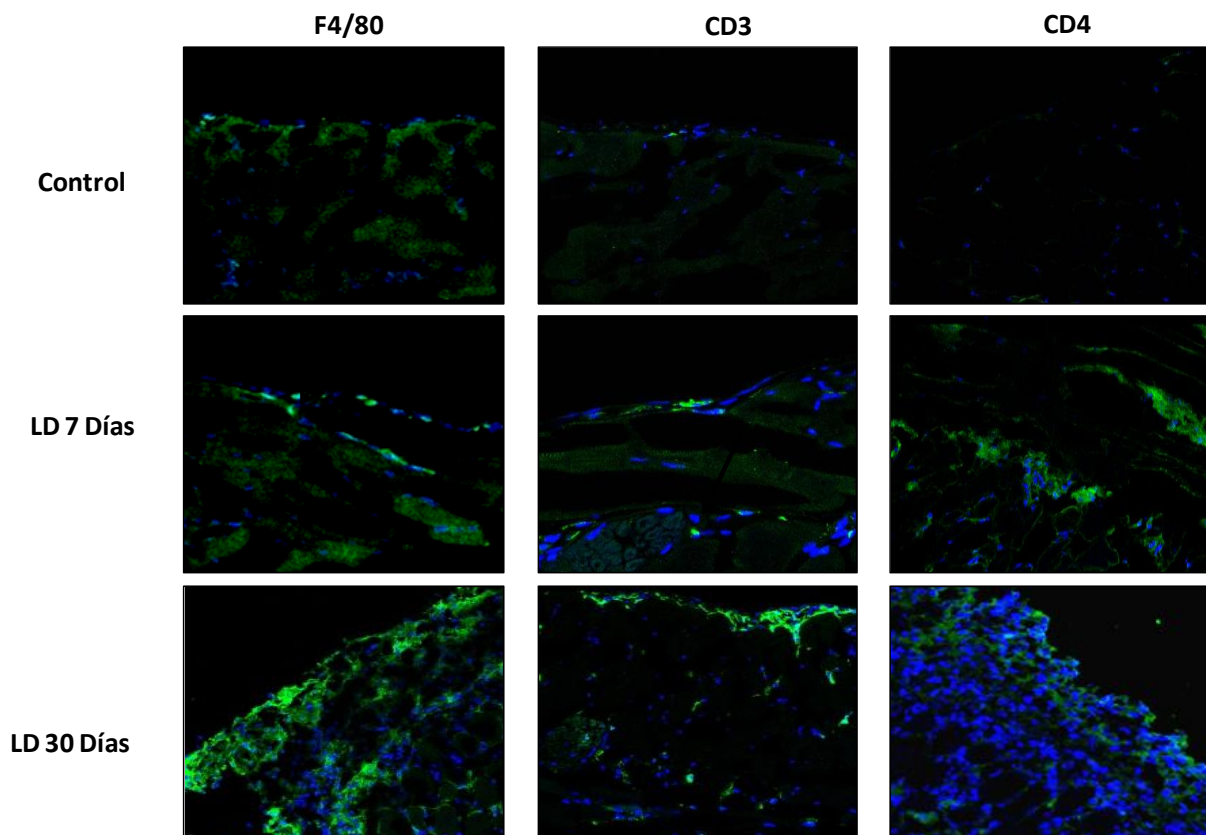
### 6.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO EN EL PERITONEO DAÑADO DE RATÓN.

Previamente se ha demostrado que tras 4 semanas de instilación diaria con LD el peritoneo murino presenta una serie de alteraciones morfológicas, caracterizadas por un aumento de grosor de la membrana peritoneal, angiogénesis en la zona submesotelial, y alteración de la función normal del peritoneo (González-Mateo GT 2009). En esta tesis se ha observado que a los 7 días estas alteraciones ya comienzan a producirse. Mediante análisis histológico de secciones peritoneales observamos un aumento significativo en el grosor de la membrana peritoneal, comparado con los ratones sin tratar, que aparece a los 7 días y alcanza el valor máximo a los 30 (Figura38).



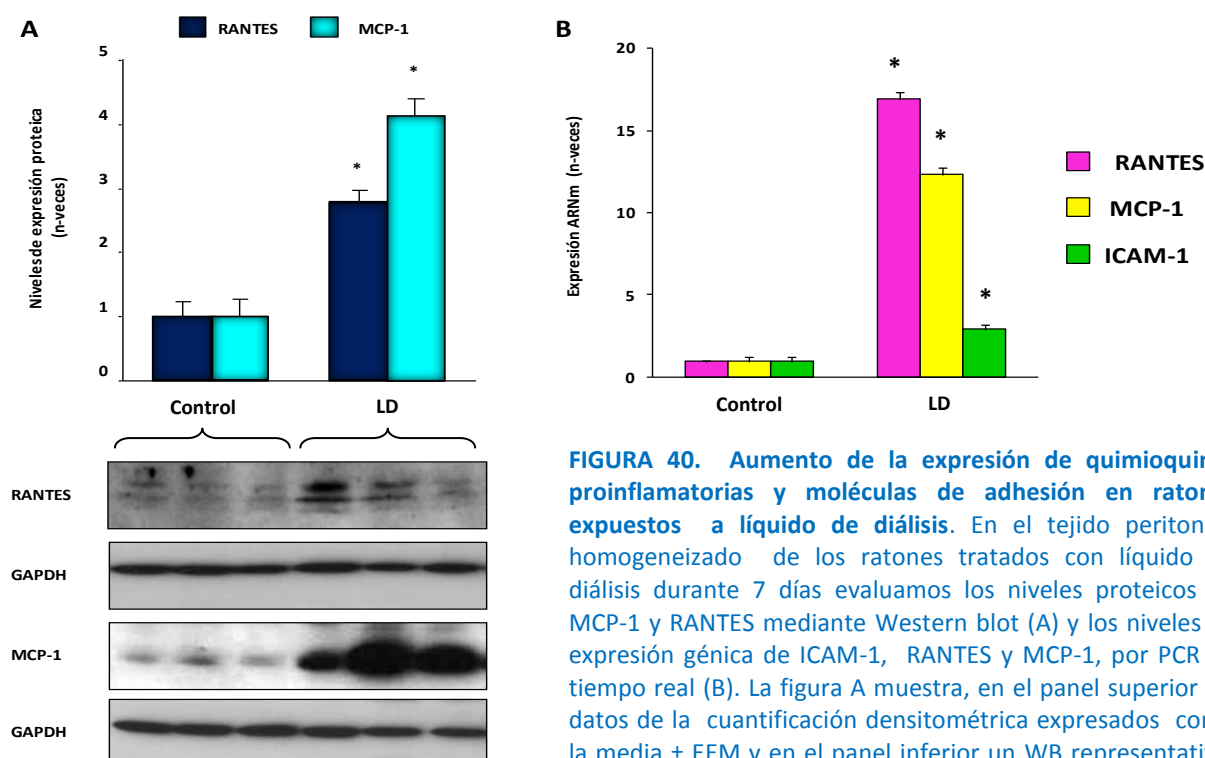
**FIGURA 38.** La exposición a líquido de diálisis indujo un engrosamiento en la membrana peritoneal en el modelo experimental murino. Tras la colocación del catéter, los ratones C57BL/6 fueron instilados diariamente con líquido de diálisis (LD) (2000 µl/ratón/día) durante 7, 15 y 30 días. La morfología del peritoneo y el grado de grosor de la membrana se determinó mediante tinción tricrómica de Masson. La figura muestra en el panel superior una micrografía representativa de 1 animal de cada grupo (200x). En el panel inferior los valores del grosor de la membrana peritoneal (en µm) expresados como media ± EEM de 6 ratones por grupo. \*p<0.05 vs. control.

La administración diaria de LD generó una respuesta inflamatoria en el peritoneo, observada desde los 7 días de exposición que se mantuvo hasta los 30 días, caracterizada por la aparición de células inflamatorias (macrófagos F4/80<sup>+</sup> y linfocitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) infiltrantes en la zona submesotelial (figura 39).



**FIGURA 39.** La exposición a líquido de diálisis aumentó el infiltrado inflamatorio en la zona submesotelial en el modelo de daño peritoneal. La imagen muestra una imagen de microscopía confocal representativa de un animal de cada grupo de 6 ratones estudiados. Los ratones instilados con líquido de diálisis presentaron tinción positiva para monocitos macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y linfocitos Th (CD4<sup>+</sup>) (200x) mientras que los controles muestran una tinción leve. Los núcleos se contrastaron con DAPI.

También se observó una sobreproducción de quimioquinas inflamatorias (MCP-1 y RANTES) (Figura 40A) y un aumento en los niveles génicos de la molécula de adhesión ICAM-1 entre los ratones instilados con LD durante 7 días, comparados con los ratones sin tratar (figura 40B).

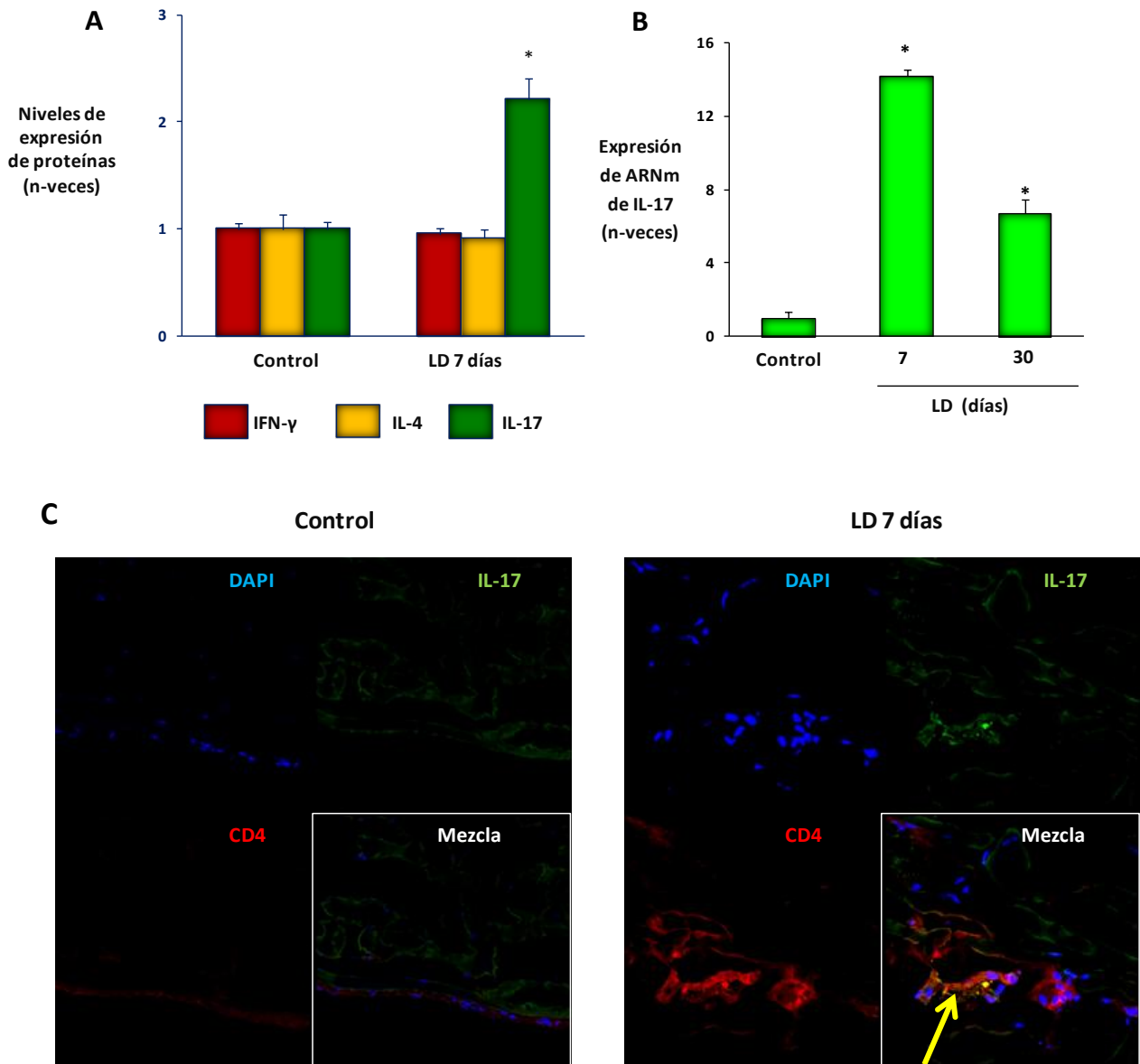


**FIGURA 40. Aumento de la expresión de quimioquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión en ratones expuestos a líquido de diálisis.** En el tejido peritoneal homogeneizado de los ratones tratados con líquido de diálisis durante 7 días evaluamos los niveles proteicos de MCP-1 y RANTES mediante Western blot (A) y los niveles de expresión génica de ICAM-1, RANTES y MCP-1, por PCR en tiempo real (B). La figura A muestra, en el panel superior los datos de la cuantificación densitométrica expresados como la media  $\pm$  EEM y en el panel inferior un WB representativo. La figura B muestra la cuantificación de los datos de PCRs expresados como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo normalizados frente al control. \*  $p < 0.05$  vs. control.

## 6.2.2. LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A LÍQUIDO DE DIÁLISIS INDUCE UN AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN LOCAL DE IL-17A.

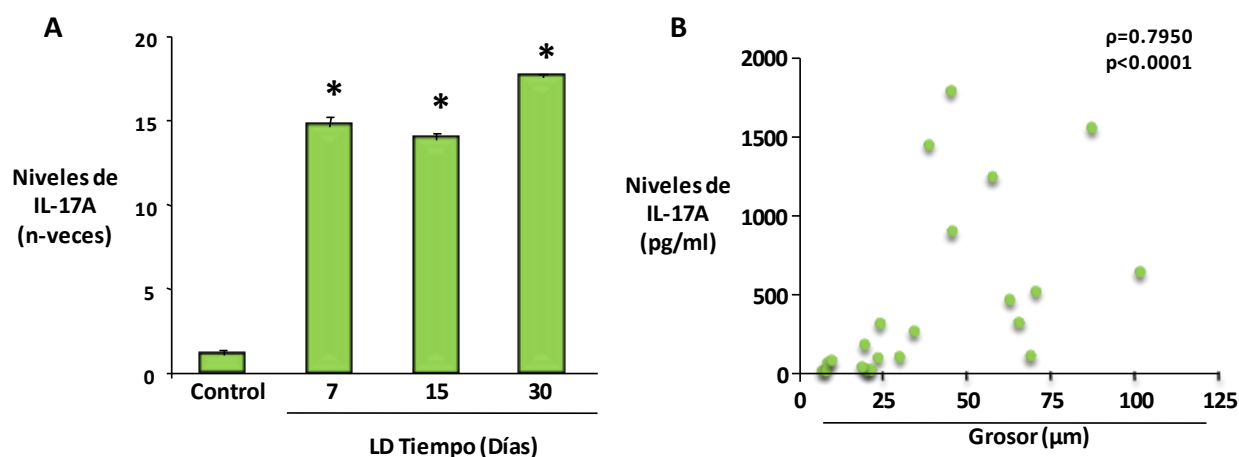
Tras comprobar que existía un proceso inflamatorio quisimos evaluar que tipo de respuesta inmune podría estar implicada, para ello analizamos las citoquinas claves de las respuestas Th1, Th2 y Th17. En los peritoneos de los ratones tratados con LD durante 7 días únicamente observamos un aumento significativo en los niveles de IL-17A pero no de IFN- $\gamma$  e IL-4 comparados con los controles. La sobreexpresión de IL-17A en el peritoneo se confirmó por PCR, observando niveles elevados de ARNm de IL-17A a 7 y 30 días. Dado que la IL-17A se produce fundamentalmente por linfocitos T activados (CD4<sup>+</sup>), células Th17 (Harrington LE 2005), realizamos una doble tinción inmunohistoquímica y observamos células infiltrantes doble positivas para CD4 e IL-17A en el peritoneo expuesto a LD (figura 41).

Estos datos confirman que la instilación con líquido de diálisis induce la presencia de linfocitos infiltrantes capaces de producir IL17A (linfocitos Th17) en la membrana peritoneal.



**FIGURA 41. La exposición crónica a líquido de diálisis indujo expresión de IL-17A en el peritoneo.** Evaluamos los niveles de las citoquinas clave en la respuesta Th1, Th2 y Th17 (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17 respectivamente) por ELISA. La Figura A muestra la cuantificación de los niveles proteicos de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17 expresados como la media  $\pm$  EEM de 6 a 9 animales por grupo normalizados frente al control. La figura B muestra los niveles de expresión génica de IL-17A determinados por PCR a tiempo real y expresados como media  $\pm$  EEM de 6 a 9 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs. control. **La exposición a líquido de diálisis induce el infiltrado submesotelial de células Th17.** La figura C muestra la imagen de una inmunofluorescencia representativa por grupo, de 6 analizados, en la que se observa la presencia de células Th17 (CD4<sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup>) en la zona submesotelial de ratones tratados con LD, mientras que no se observa en los controles. La flecha amarilla indica las células doble positivas. Los núcleos se contrastaron con DAPI.

En líquido obtenido por lavado de la cavidad peritoneal se determinaron los niveles de IL-17A mediante ELISA. En los ratones que fueron instilados con LD se observó un aumento de IL-17A tanto a 7 como a 30 días, en comparación con los controles (figura 42). Mediante una correlación de Spearman, determinamos que los valores de IL-17A se correlacionaban significativamente y de forma positiva con el aumento de grosor en la membrana peritoneal (figura 42). Estos datos sugieren que IL-17A podría estar implicada en el daño peritoneal causado por exposición a LD.

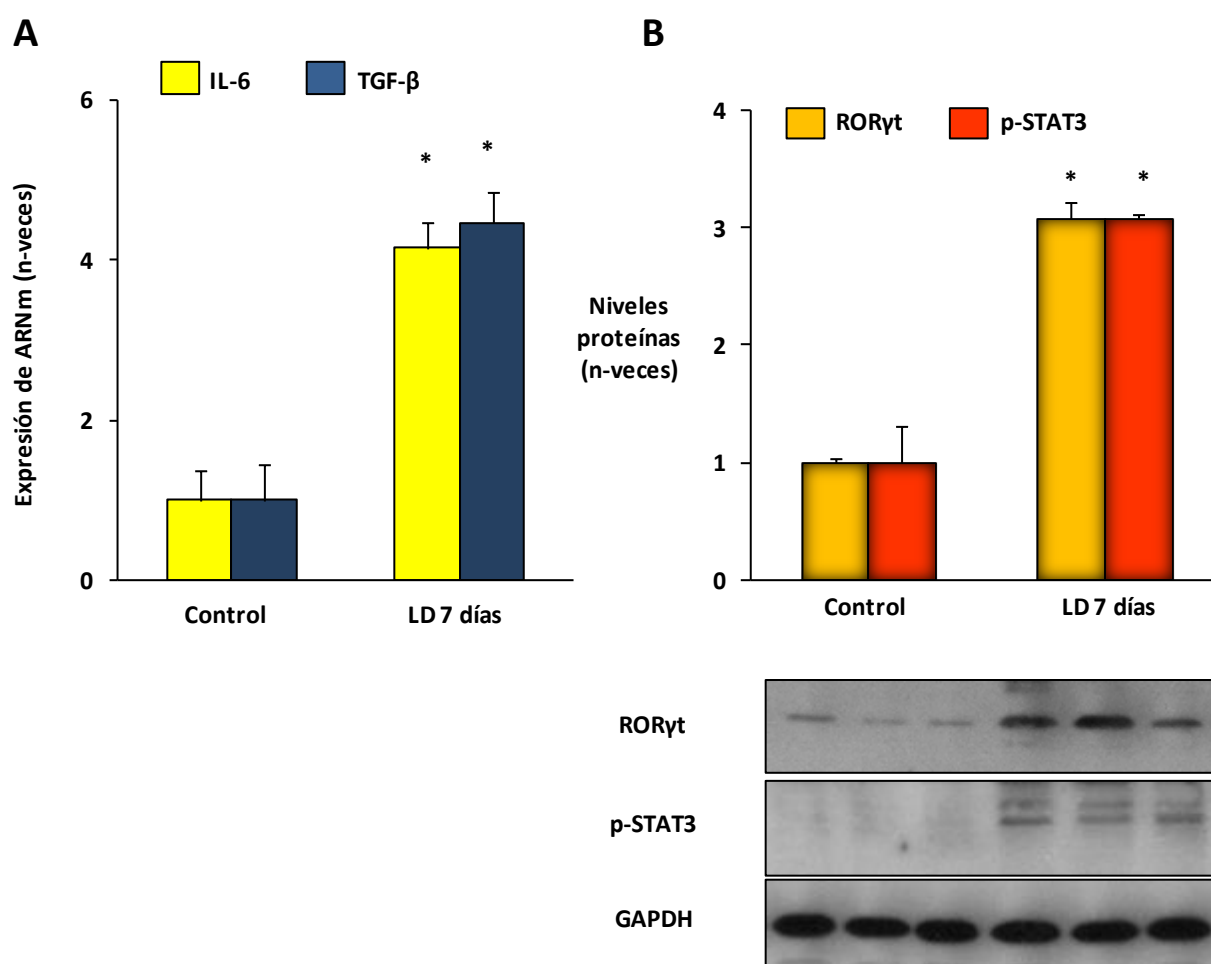


**FIGURA 42. La exposición a líquido de diálisis aumentó de forma significativa los niveles IL-17A en la cavidad intraperitoneal.** En el líquido intraperitoneal analizamos la concentración de IL-17A por ELISA. La Figura A muestra la cuantificación de los niveles de IL-17A en pg/ml expresados como la media  $\pm$  EEM de 6-9 animales por grupo. \* $p<0.05$  vs. control. **Los niveles de IL-17A se correlacionaban con el grosor de la membrana.** La figura B muestra la correlación Spearman entre los niveles de IL-17A (pg/ml) y el grosor de la membrana en  $\mu\text{m}$ .

### 6.2.3. ACTIVACIÓN DE CITOQUINAS Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS CON LA RESPUESTA TH17 EN EL PERITONEO DAÑADO.

IL-6 es la citoquinas clave en la activación de la respuesta Th17. Dependiendo de contexto celular, TGF- $\beta$  actúa inhibiendo la activación de las respuestas Th1/Th2 y potenciando la Th17 (Bettelli E 2006 Mangan PR 2006; Veldhoen M 2006). En el peritoneo de ratones infundidos con líquido de diálisis hemos evaluado los niveles génicos de IL-6 y TGF- $\beta$  observando un aumento significativo en su expresión comparados con los controles (figura 43A). También hemos evaluado los niveles tisulares de los factores de transcripción claves para la diferenciación de la respuesta Th17 (ROR $\gamma$ t y STAT). El análisis por WB muestra un aumento significativo en los niveles tisulares tanto de ROR $\gamma$ t como de STAT-3 fosforilado en los peritoneos dañados por exposición a LD (Figura 43B).

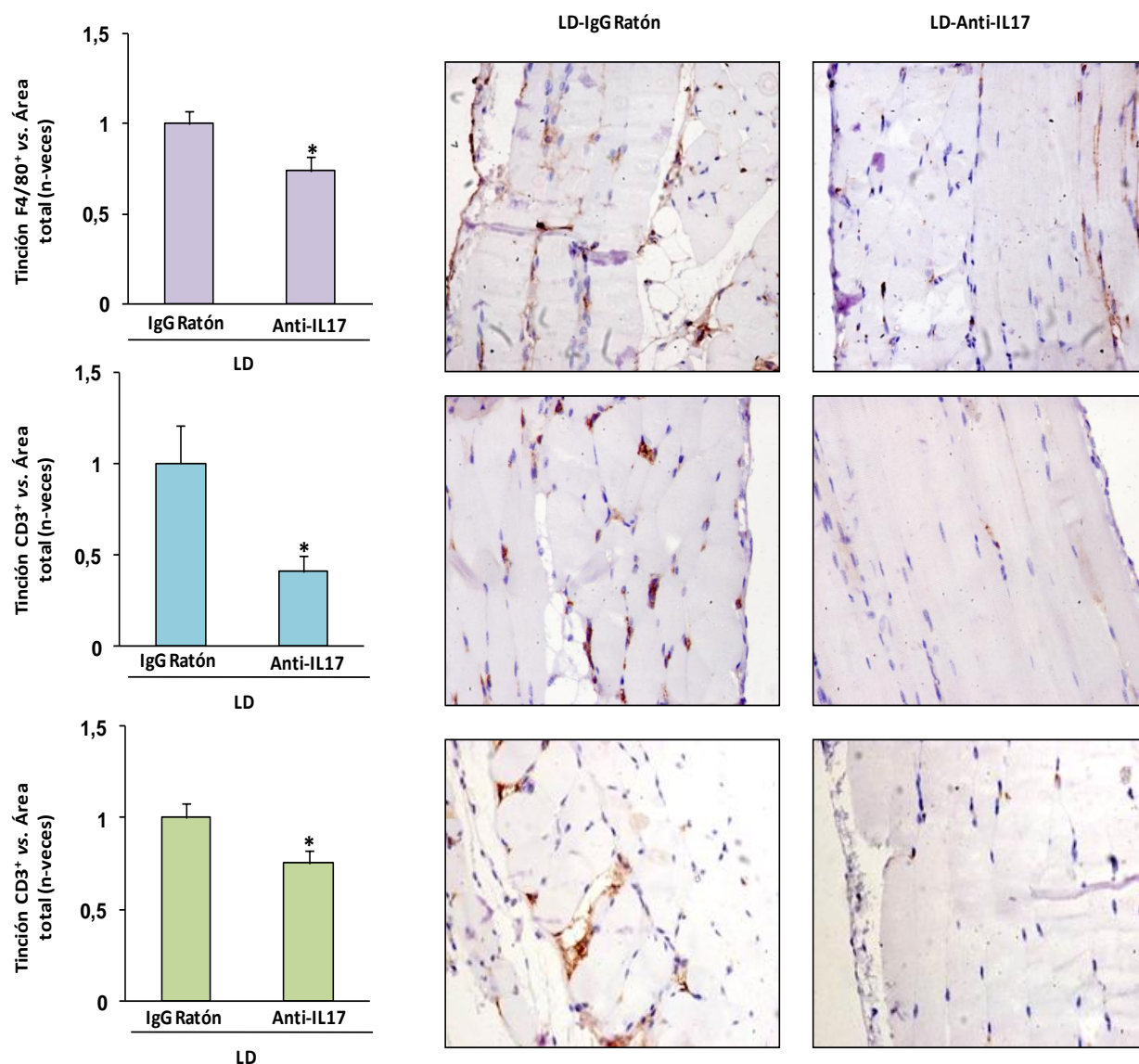




**FIGURA 43. La exposición a líquido de diálisis activa factores relacionados con la respuesta Th17 en el peritoneo.** En el tejido peritoneal homogeneizado de los ratones tratados con LD a 7 días evaluamos citoquinas (A) y factores de transcripción (B) relacionados con la respuesta Th17. La figura A muestra los niveles de expresión génica de IL-6 y TGF- $\beta$  determinados por PCR a tiempo real. La figura B muestra en la parte superior el análisis densitométrico de los niveles peritoneales de ROR $\gamma$ t y p-STAT-3 determinados por WB y en la parte inferior un gel representativo. Todos los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 6-9 animales por grupo normalizados frente al control. \*  $p < 0.05$  vs. control.

### **6.3. LA INHIBICIÓN DE IL-17A DISMINUYE EL INFILTRADO INFLAMATORIO PERITONEAL CAUSADO POR EXPOSICIÓN A LÍQUIDO DE DIÁLISIS.**

Para demostrar la participación de la respuesta Th17 en el daño causado por exposición reiterada a líquido de diálisis, inhibimos la citoquina efectora de la respuesta, IL-17A, con un anticuerpo neutralizante según se detalla en el apartado 1.4.1 de métodos. El anticuerpo bloqueante del IL-17A fue administrado un día antes de empezar la diálisis y después cada 3 días hasta el sacrificio. Como control se utilizaron ratones instilados con LD y tratados con una IgG control del mismo isotipo. En el peritoneo de los ratones instilados con LD la inhibición de IL-17A disminuyó el número de células inflamatorias infiltradas, tanto macrófagos (F4/80 $^{+}$ ) como linfocitos (CD3 $^{+}$  y CD4 $^{+}$ ), en la zona submesotelial (figura 44).



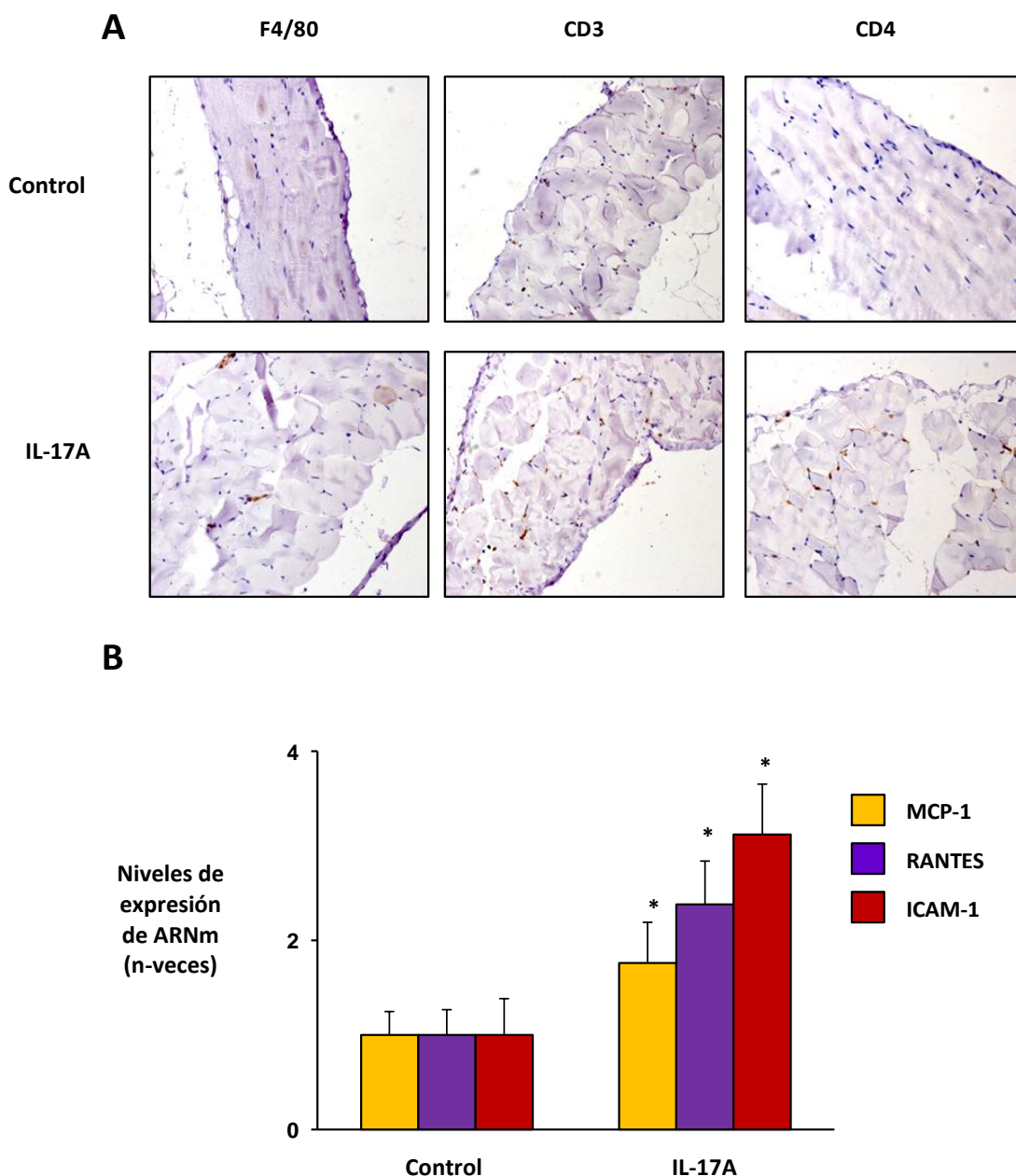
**FIGURA 44. El bloqueo de la IL-17A disminuyó el infiltrado inflamatorio en la zona submesotelial inducido por la exposición a líquido de diálisis.** La figura muestra en el panel de la izquierda la cuantificación de las células F4/80<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> expresada como tinción positiva frente a la superficie total y normalizada frente al control. Los resultados se representan como la media como  $\pm$  EEM de 7-8 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs. IgG-control. En el panel lateral izquierdo se muestra una inmunohistoquímica representativa de cada grupo. (200 x).

## 7. ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO *IN VIVO* DE IL-17A EL PERITONEO DE RATÓN.

Para profundizar en los efectos de IL-17A en el peritoneo el siguiente abordaje realizado en esta tesis consistió en investigar el efecto directo de esta citoquina en el peritoneo en ratones sin daño peritoneal previo. Los ratones fueron tratados con una única inyección IL-17A (10ng/peso del ratón), vía intraperitoneal, con un volumen final 200 $\mu$ l que no produce daño por sobrecarga de volumen. La membrana peritoneal se estudió a los 10 días. Como control se utilizaron ratones inyectados con el mismo volumen de salino.

### 7.1. IL-17A *IN VIVO* CAUSA UNA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL PERITONEO.

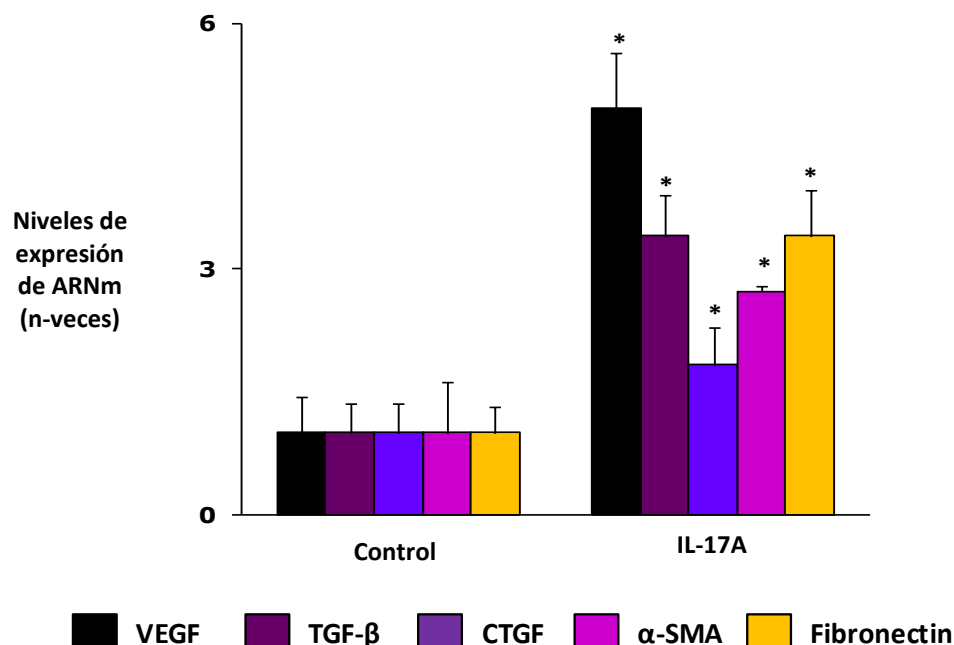
La administración de IL-17A aumentó el infiltrado de macrófagos y linfocitos en la zona submesotelial compacta (figura 45) e indujo la expresión de genes proinflamatorios, incluyendo citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (figura 45).



**FIGURA 45. La administración intraperitoneal de IL-17A en ratones provocó un aumento del infiltrado inflamatorio y de la expresión de quimiocinas proinflamatorias en el peritoneo.** En secciones peritoneales de ratones inyectados con IL-17A se caracterizaron las células inflamatorias mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-F4/80 (específico para monocitos y macrófagos), anti-CD3 (marcador de linfocitos T) y anti-CD4 (marcador de linfocitos Th). La figura A muestra un ejemplo representativo de un animal control y uno tratado con IL-17A a los 10 días (magnificación 200x). En los peritoneos de ratones tratados con IL-17A evaluamos los niveles de expresión génica de MCP-1, RANTES e ICAM-1 por PCR en tiempo real (B). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo normalizados frente al control. \*  $p < 0.05$  vs. control.

## 7.2. IL-17A INDUCE FACTORES PROANGIOGÉNICOS Y PROFIBRÓTICOS EN EL PERITONEO.

En los ratones inyectados con IL-17A no se observó un aumento significativo en el grosor de la membrana (no mostrado), pero si presentaron un aumento significativo en la expresión de genes profibróticos como TGF- $\beta$ 1, PAI-1, proteínas de matriz extracelular (fibronectina) y marcadores de fibroblastos activados ( $\alpha$ -SMA) (figura 46). Además, la administración de IL-17A aumentó la expresión del factor proangiogénico VEGF en el peritoneo. Estos datos sugieren la participación local de IL-17A en la respuesta inflamatoria y un posible papel en la regulación de la respuesta profibrótica y proangiogénica.



**FIGURA 46. La administración intraperitoneal de IL-17A en ratones aumentó la expresión de factores profibróticos y pro-angiogénicos en el peritoneo.** Los niveles de expresión génica se evaluaron por PCR en tiempo real. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 6 animales por grupo normalizados frente al control.

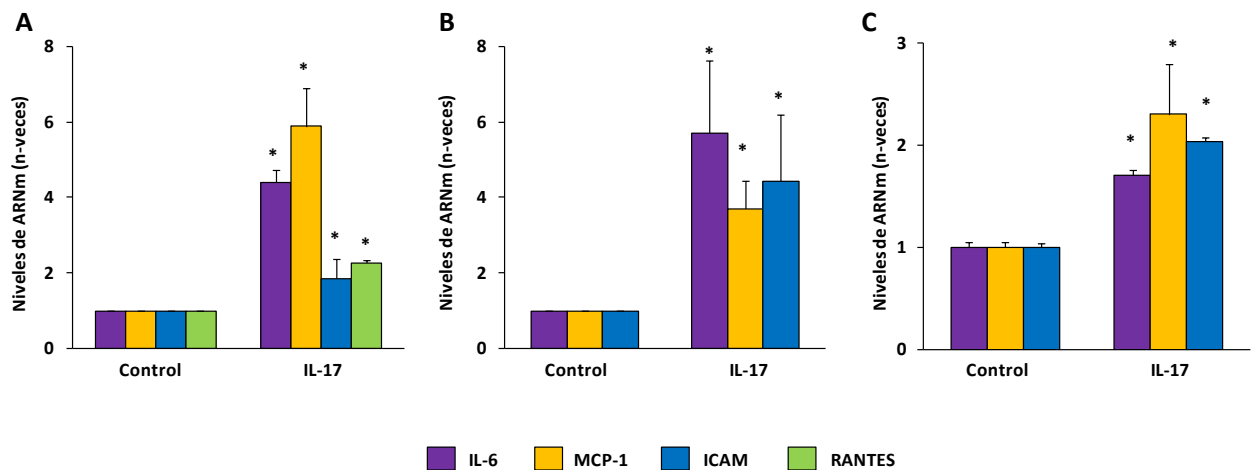
\*  $p < 0.05$  vs. control.

## 8. ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA RESPUESTA DE IL-17A.

Los resultados *in vivo* muestran el papel de IL-17A como mediador del proceso inflamatorio local en distintos tejidos (riñón, aorta y peritoneo). Mediante estudios *in vitro* hemos evaluado si IL-17A es capaz de regular la expresión de diferentes mediadores proinflamatorios en distintos tipos celulares.

### 8.1. EFECTO DE IL-17A EN CÉLULAS RENALES.

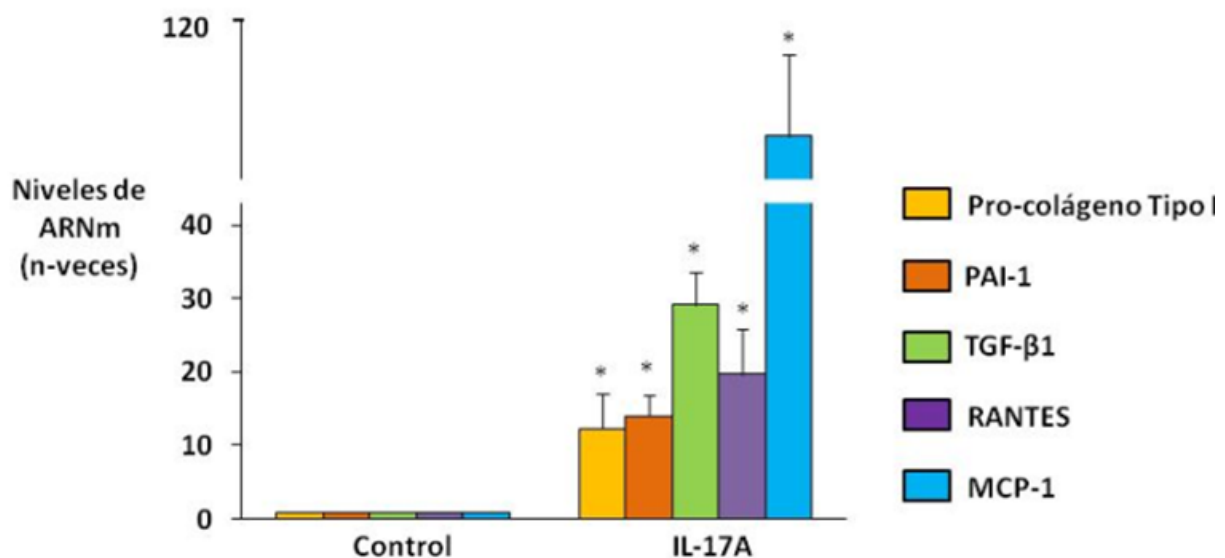
En dos líneas de células renales murinas, una de células túbuloepiteliales (MCTs) y otra de fibroblastos renales (TFBs), y en una línea de células túbuloepiteliales humanas (HK2) hemos estudiado los efectos a nivel génico de la estimulación con IL-17A. La incubación con IL-17A recombinante humana (10ng/ml) durante 6 horas aumentó la expresión génica de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión en todas las líneas celulares (figura 47).



**FIGURA 47. IL-17A aumentó la expresión génica de factores proinflamatorios en células renales.** Estimulamos MCTs (A) TFBs (B) y HK2 (C) con IL-17A recombinante durante 6 horas y evaluamos los niveles de expresión génica por PCR en tiempo real. Las gráficas muestran los datos normalizados de la cuantificación expresados como media  $\pm$  EEM de 3-4 experimentos independientes. \* p < 0.05 vs. control.

## 8.2. EFECTO DE IL-17A EN CÉLULAS MESOTELIALES HUMANAS.

En último lugar quisimos determinar el efecto *in vitro* de IL-17A en células mesoteliales humanas en cultivo para confirmar los efectos observados *in vitro*. Las células mesoteliales se obtuvieron a partir de un cultivo primario de pacientes sin patología abdominal según se describe en métodos. En células tratadas con IL-17A recombinante humana (10ng/ml) se observó un aumento significativo de la expresión génica de factores proinflamatorios y profibróticos (figura 48).



**FIGURA 48. IL-17A aumentó la expresión génica de factores profibróticos y proinflamatorios en mesoteliales humanas (HOMCs).** Estimulamos HOMCs con IL-17A durante 6 horas. Las gráficas muestran los datos normalizados de la cuantificación por PCR a tiempo real expresados como media  $\pm$  EEM de 3-4 experimentos independientes. \* p < 0.05 vs. control.





## ***V. DISCUSIÓN***





## 1. AMPLIACIÓN DE LA VISIÓN DE CTGF

En diversas patologías humanas de tipo fibroproliferativo, como fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, osteoartritis, aterosclerosis y numerosas patologías renales se ha descrito una sobreexpresión de CTGF asociada, temporal y espacialmente, con áreas fibróticas (Spagnoli A 2005; Blom IE 2002; Gupta S 2000, Cicha I 2005, Leask A 2002; Yokoi H 2002; Rachfal AW 2005). Sin embargo, el papel de CTGF como mero marcador o como causa de fibrosis todavía no ha sido esclarecido. La hipótesis actual más aceptada es que CTGF actúa como mediador profibrótico de factores clásicos como TGF- $\beta$ 1 y Ang II.

El uso de antagonistas de CTGF como ARNs antisentido, anticuerpos neutralizantes, ARN silenciadores o ribocimas cabeza de martillos (*hammerhead*) (Gao RP 2009) ha demostrado una gran efectividad en el bloqueo de señales profibrogénicas *in vitro* y ha dado resultados prometedores en la prevención de la fibrosis experimental (Sisco M 2008, Brigstock DR 2009, Ponticos M 2009, Wang Q 2011, Leask A 2009). Varios grupos de investigación, incluido el nuestro, han demostrado que el bloqueo de la expresión génica de CTGF mediante el uso de oligonucleótidos anti-sentido inhibe los efectos profibróticos de Ang II en células renales (tubulares y mesangiales) y vasculares en cultivo (Carvajal G 2008, Rodrigues-Díez R 2008, Rupérez M 2007, Chen L 2007). En estudios *in vivo* el uso de oligonucleótidos anti-sentido frente a CTGF disminuyó la fibrosis túbulointersticial en un modelo de nefropatía obstructiva en ratas (Yokoi H 2004) y la progresión del daño en nefropatía diabética en ratón (Guha M 2007). El uso de ARN de interferencia frente a CTGF atenúo el remodelado vascular y los cambios en la adventicia observados en un modelo de angioplastia carotídea en ratas (Kundi R 2009) y el remodelado vasculo-pulmonar en un modelo de ratas expuestas al humo de cigarrillos (Wang Q 2011). Estudios en células en cultivo han demostrado que la estimulación con CTGF recombinante aumenta la producción de proteínas de matriz extracelular, la proliferación y migración de fibroblastos e induce transición epitelio-mesénquima en células epiteliales (Frazier K 1996, Moussad EE 2000, Yokoi H 2002, Blom IE 2002, Zhang C 2004). En esta tesis hemos descrito que la administración de CTGF recombinante en ratones C57BL/6 no produce cambios estructurales ni funcionales en el riñón. Sin embargo, aunque a nivel renal apreciamos una activación transitoria de genes profibróticos y de marcadores mesenquimales, hemos observado que CTGF no aumenta la síntesis de TGF- $\beta$ 1 ni la acumulación de colágeno en riñón y en aorta; mostrando resultados similares a los observados por otros autores en distintos tejidos. En pulmón de rata, la sobreexpresión de CTGF sólo es capaz de inducir la expresión génica de procólágeno y una acumulación transitoria de matriz extracelular, pero no es suficiente para inducir una fibrosis progresiva (Bonniaud P 2003); un efecto similar se observó en tejido sinovial de ratón (Blaney-Davidson EN 2006). Además, en un modelo de fibrosis en piel se observó que CTGF solo no era capaz de inducir fibrosis y que era necesaria la aplicación simultánea de TGF- $\beta$ 1 para causar una fibrosis persistente (Mori T 1999). En ratones transgénicos que sobreexpresan CTGF de forma selectiva en podocitos, no se observó ninguna anormalidad a nivel glomerular ni proteinuria, sin embargo estos ratones eran más susceptibles a diabetes inducida por estreptozotocina (Yokoi H 2008). Por otro lado, aunque se ha descrito aumento de CTGF en miocardio en insuficiencia cardíaca (Ahmed MS 2004 y 2005) existen varios

estudios que muestran efectos cardio-protectores de este factor (Panek AN 2009, Ahmed MS 2011). Los datos presentados en esta tesis muestran que, si bien CTGF *in vivo* no induce fibrosis en los dos órganos estudiados, el riñón y la aorta, si induce una clara respuesta inflamatoria sostenida en el tiempo. Estos resultados sugieren un cambio de concepto en el papel *in vivo* de CTGF además de como mediador profibrótico a una verdadera citoquina con efectos proinflamatorios directos (figura 49).

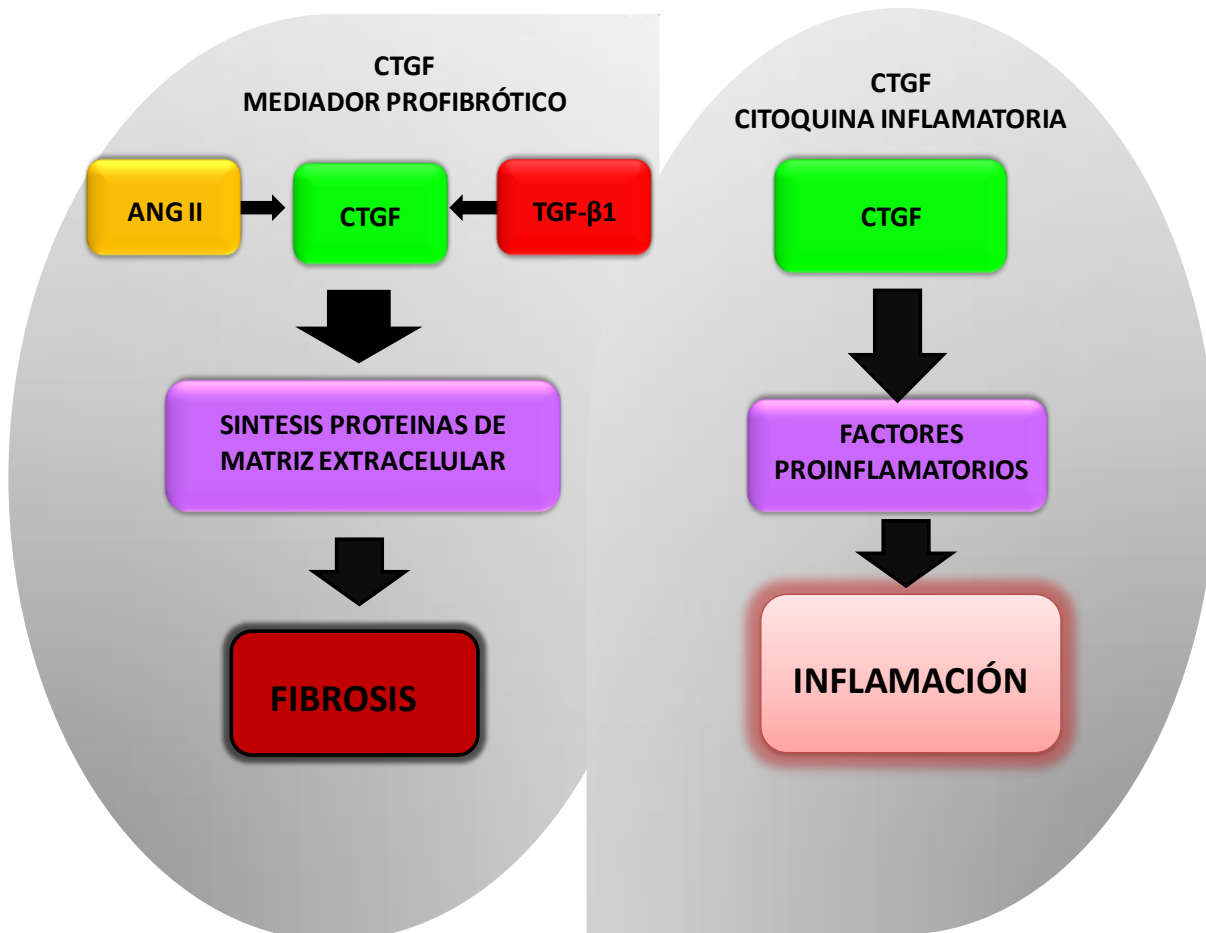


FIGURA 49. Nueva visión de las acciones de CTGF *in vivo*.

Recientemente se ha descrito que la cepa de ratón utilizada en los modelos experimentales influye en la respuesta obtenida (Reynolds J 2011). Un estudio comparativo entre varias cepas de ratón incluidas ICR, C57BL/6J y C3H/HeN, mostró que la cepa IRC desarrollaba una mayor fibrosis hepática cuando era infectada con *Schistosoma mansoni* mientras que los ratones C57BL/6 eran más resistentes al desarrollo de la fibrosis (Cheever AW 1983). En un modelo de cicatrización de herida inducida por esponja, se observó que la cepa NWZ presentaba una menor inflamación, pero una fibrosis mayor y una angiogénesis más temprana que los ratones Balb/c (Campos PP 2008). Estudios comparativos entre varias cepas de ratón y rata en las que se realizaron varios modelos de glomerulonefritis experimental autoinmune mostró una clara diferencia en la respuesta obtenida entre las distintas cepas (tabla 8) (Reynolds J 2011) lo que indica que, muchos de los modelos realizados no son extrapolables a otras especies e incluso, dentro de la misma especie, a otras cepas.

Los estudios realizados en esta tesis, al igual que los modelos de sobreexpresión de CTGF se han realizado en ratones de la cepa C57BL/6, por lo que la ausencia de una respuesta fibrótica podría deberse a la cepa empleada y sería necesarias más comprobaciones para descartar el papel de CTGF como factor profibrótico *per se*.

Cepa Rata	Inmunógeno	Severidad de la Glomerulonefritis	Cepa Ratón	Inmunógeno	Severidad de la Glomerulonefritis
WKY	Bovine GBM	+++			
SHR	Bovine GBM	+++			
F344	Bovine GBM	+/-			
LEW	Bovine GBM	+/-			
BN	Rat GBM	++	SJL	Purified bovine $\alpha$ 3(IV)NC1	+++
PVG	Rat GBM	+	C57/BL/6	Purified bovine $\alpha$ 3(IV)NC1	+
DA	Rat GBM	+	DBA/2	Purified bovine $\alpha$ 3(IV)NC1	+
LEW	Rat GBM	-	CBA	Purified bovine $\alpha$ 3(IV)NC1	-
WAG	Rat GBM	-	A/J	Purified bovine $\alpha$ 3(IV)NC1	-
WKY (RT1-l)	Rat GBM	+++	AKR	Purified bovine $\alpha$ 3(IV)NC1	-
WKY (RT1-k)	Rat GBM	++	DBA/1	Recombinant human $\alpha$ 3(IV)NC1	+++
WKY	Human $\alpha$ 3(IV)NC1	+++	C57/BL/6	Recombinant human $\alpha$ 3(IV)NC1	++
WKY	Rat $\alpha$ 3(IV)NC1	+++	AKR	Recombinant human $\alpha$ 3(IV)NC1	++
LEW	Rat $\alpha$ 3(IV)NC1	-	NOD	Recombinant human $\alpha$ 3(IV)NC1	+
WKY	Human pCol(28-51)	++	C57/BL/6	Recombinant mouse $\alpha$ 3(IV)NC1	+++
WKY	Rat pCol(28-40)	+++	CD1	Recombinant rat $\alpha$ 3(IV)NC1	+++
WKY	Rat pCol(24-38)	+++			

**TABLA 8.** Resultados comparativos del efecto de un modelo de glomerulonefritis sobre distintas cepas de rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*) (Reynolds J. 2011).

## 2. PAPEL DE LA RESPUESTA TH17 Y SU CITOQUINA EFECTORA IL-17A EN INFLAMACIÓN

En los últimos años, estudios *in vitro* han sugerido que CTGF participa en la regulación de procesos proinflamatorios (Kular E 2011). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que CTGF induce una respuesta inflamatoria aguda, a las 24 horas, dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B en el riñón (Sánchez-López E 2009a). Los resultados presentados en esta tesis amplían esta visión y demuestran que CTGF es capaz de promover una respuesta inflamatoria sostenida en el riñón, gracias a la activación local de la respuesta Th17. En los estudios realizados en ratón hemos observamos que una única inyección intraperitoneal de CTGF provoca una respuesta inflamatoria, que se mantiene a lo largo de 15 días alcanzando un pico máximo a los 10 días. Esta respuesta se caracteriza por un aumento de células infiltrantes inflamatorias, como macrófagos y linfocitos, y una inducción de la síntesis de factores proinflamatorios clásicos, como IL-6, MCP-1 o RANTES. La valoración de las citoquinas claves en la distintas respuestas Th demostró que CTGF *in vivo* aumenta los niveles renales de IL-17A, la citoquina efectora de la respuesta Th17, mientras que no afecta a los niveles de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, citoquinas clave de las respuestas Th1 Th2 y Treg respectivamente. Lo que sugiere que CTGF es capaz de activar la respuesta Th17, sin modular ninguna de las otras respuestas, al menos a nivel renal, en ratones. Por el contrario, la administración de CTGF no aumentó los niveles de IL-17A en suero, lo que sugiere que CTGF induce la activación de IL-17A a nivel local.

Como se ha comentado anteriormente, la diferenciación de las células CD4<sup>+</sup> en sus distintos subtipos es un proceso altamente regulado que implica la activación de factores de transcripción específicos para cada respuesta. La diferenciación de las células Th17 depende de la activación de ROR $\gamma$ t y STAT-3 que está mediada por IL-6 (Ivanov II 2006, Chaudhry A 2009, Egwuagu CE 2009, Mathur AN 2007). Nuestros resultados muestran que la administración sistémica de CTGF aumenta los niveles renales de IL-6 y ROR $\gamma$ t y activa STAT-3, demostrando que este mecanismo molecular está activado localmente durante el daño renal mediado por CTGF y contribuye a la inducción de la respuesta Th17.

La inyección de células Th17 en ratones sanos provocó albuminuria a los 3 días, infiltración glomerular de neutrófilos y aumento de los niveles renales de CXCL1, demostrando una implicación clara de estas células en el daño renal (Summers SA 2009). En riñones de ratones tratados con CTGF hemos encontrado células infiltrantes CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>, lo que muestra que las células Th17 pueden contribuir al daño renal inducido por CTGF. Sin embargo, además de las células Th17 existen otras células capaces de producir IL-17A (HamadaH 2009, Roark CL 2008, Rachitskaya AV 2008, Michel ML 2007, Li L 2010, Gaffen S 2009, Loverre A 2011, Miossec P 2009). En el modelo de daño renal por obstrucción unilateral del uréter, se ha observado que la mayor fuente de IL-17A no son las células Th17 sino los neutrófilos, que contribuyen al daño renal a través de la activación de linfocitos T NK y la producción de IL-12/INF- $\gamma$  (Li L 2010). En glomérulos de pacientes con nefritis lúpica se detectaron elevados niveles de IL-17A que eran producidos por células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> (Crispin JC 2008), y en estudios de rechazo de trasplante renal se han observado células túbuloepiteliales positivas para IL-17A (Loverre A 2011). Los ratones tratados con CTGF, además de células CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>, presentaban tinción positiva para IL-17A, en células túbuloepiteliales (CD4<sup>-</sup>) lo que sugiere que CTGF *in vivo*, podría inducir la producción de IL-17A en células renales. Además, las biopsias de pacientes con nefropatía diabética analizadas en esta tesis mostraban diversos tipos celulares, entre los que se incluían células con morfología linfoide y túbuloepiteliales. Estos datos indican que en situaciones de daño renal las células túbuloepiteliales serían capaces de producir IL-17A contribuyendo al proceso inflamatorio renal.

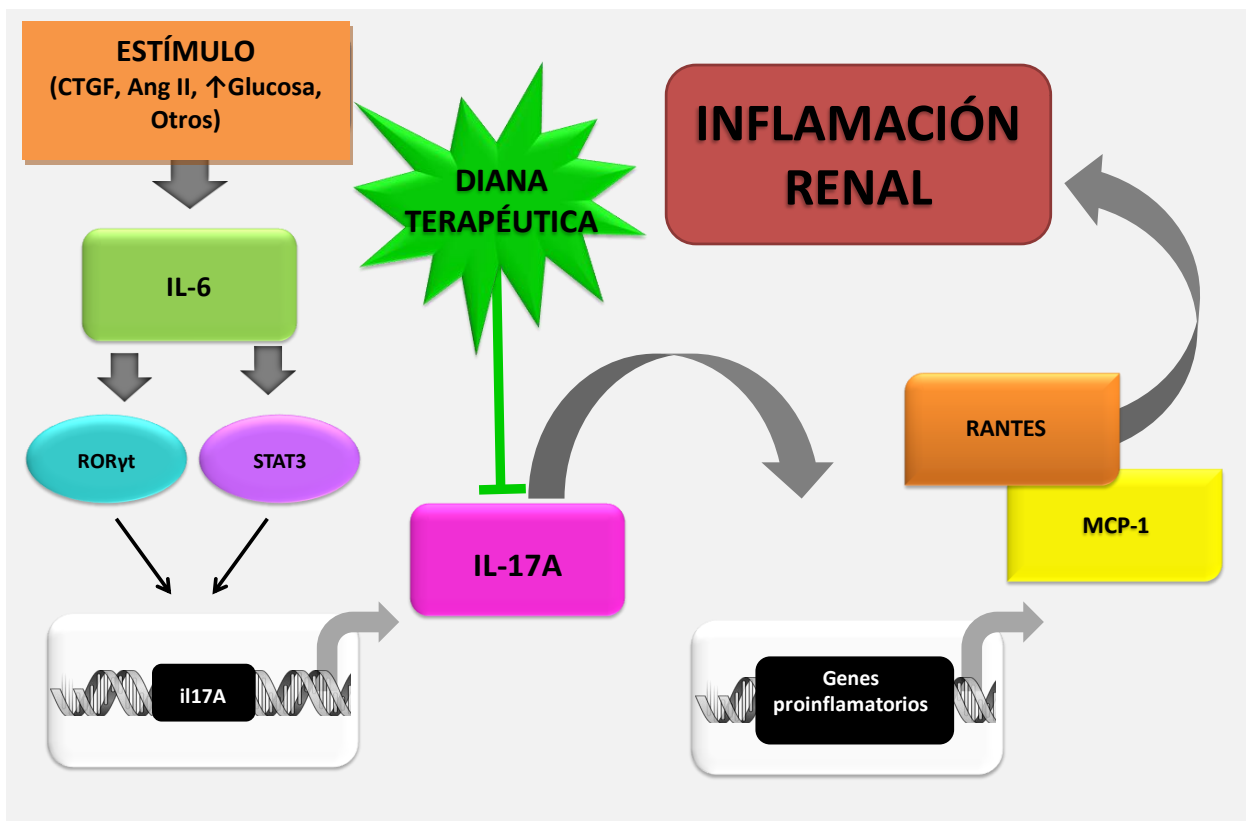
Existen numerosos tipos celulares que expresan receptores para IL-17A, incluidas la mayoría de las células residentes del riñón (túbuloepiteliales, fibroblastos y mesangiales), células endoteliales, células de músculo liso vascular, macrófagos y células dendríticas. En presencia de IL-17A estas células se activan y sintetizan una batería de citoquinas y quimioquinas entre las que destacan IL-16, IL-8, MCP-1, RANTES, CXCL1 y IL-8, que favorecen el reclutamiento de más células inflamatorias exacerbando la respuesta inflamatoria (Turner JE 2010). Además, IL-17A también puede promover la quimiotaxis de monocitos *in vitro* e *in vivo* (Sergejeva S 2005, Shahrara S 2009). En esta tesis, hemos confirmado que la estimulación con IL-17A recombinante induce la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión como ICAM-1, en células renales en cultivo, tanto túbuloepiteliales murinas y humanas, como en fibroblastos murinos.

Diversos estudios han demostrado que IL-17A está aumentada en glomerulonefritis inmunes, incluidas glomerulonefritis antimieloperoxidasa, glomerulonefritis crescente y nefritis lúpica, así como en daños renales no asociados a procesos inmunes, como los modelos experimentales de isquemia reperfusión o de obstrucción unilateral del uréter (Kitching AR 2011, Turner JE 2010). En esta tesis hemos ampliado el espectro de enfermedades renales que presentan aumento renal de IL-17A describiendo la presencia de esta citoquina en biopsias renales de pacientes con nefropatía diabética, una de las principales causas de ERC (Mezzano SA 2005, Egido J 2011). En un estudio reciente se han observado que los niveles de IL-17A en sangre de pacientes con diabetes estaban elevados en comparación con controles sanos, sin embargo en pacientes con nefropatía diabética estos niveles estaban disminuidos incluso en comparación con controles sanos (Arababadi MK 2010). Una posible explicación podría ser atribuida a la pérdida de IL-17A en la orina debido al tamaño de la molécula (35kDa) y al aumento de la proteinuria en estos pacientes. En cambio, en un estudio donde se determinaron los niveles de IL-17A en orina de pacientes con diversas nefropatías se observó un aumento de IL-17A en pacientes con nefropatía diabética (Matsumoto K 2002). Todos estos datos, unidos a la importancia de la nefropatía diabética como principal causa de ERC hacen necesario un estudio más exhaustivo del papel de IL-17A en esta enfermedad. En el modelo experimental de diabetes inducido por estreptozotocina en ratas, hemos observado un aumento en los niveles renales de IL-17A. Sin embargo, una limitación de nuestro estudio es que no se ha podido realizar el estudio del tratamiento con anticuerpo neutralizante por su elevado coste económico, por lo que serán necesarios estudios futuros en modelos murinos en ratones deficientes en IL-17A o su receptor para determinar la contribución de la respuesta Th17 a la nefropatía diabética.

Junto con la diabetes, la hipertensión arterial es una de las principales causas de ERC (Mezzano SA 2005, Egido J 2011). Uno de los principales factores implicados en el daño renal es la activación del SRA, tanto por su efecto sobre la hipertensión arterial, como por el papel de Ang II como citoquina proinflamatoria y profibrótica. En el modelo de ratas espontáneamente hipertensas y en el de infusión de Ang II hemos descrito un aumento en los niveles renales de IL-17A, asociado a la presencia de células inflamatorias. La relación entre Ang II y la respuesta Th17 ha sido demostrada en varios modelos experimentales. En el modelo de hipertensión mediada por Ang II se han observado niveles elevados de IL-17A en suero de (Madhur MS 2010). Además, en un modelo experimental de encefalitis autoinmune el tratamiento con iECAS o con antagonistas del receptor AT1 modularon la respuesta Th17 (Platten M 2009). En ratones diabéticos (KK-Ay) se han observado niveles elevados de IL-17A asociados a resistencia a insulina mediada por Ang II que disminuyeron tras el tratamiento con antagonistas AT1 (Telmisartan y Losartan) (Ohshima K 2010). Los datos presentados en esta tesis sugieren un papel importante de la respuesta Th17 en la patología renal, independientemente de la etiología y sitúan a IL-17A, la citoquina efectora de la respuesta, como una diana terapéutica a considerar en el tratamiento de la ERC (figura 50).

En varios modelos de glomerulonefritis experimental autoinmune se ha observado que los ratones deficientes en IL-17A presentan una disminución en el grado de lesión glomerular y una mejora de la función renal (Ooi JD 2009, Paust HJ 2009, Zhang Z 2009, Gan PY 2010), sin embargo, existen pocos datos del efecto de la inhibición de IL-17A en otros modelos de daño renal.

En esta tesis hemos demostrado que en dos modelos experimentales no inmunes de daño renal en ratón, como son el mdelo de administración de CTGF y el UUO, la inhibición de IL-17A disminuyó el número de células infiltrantes y la expresión renal de quimioquinas proinflamatorias en el riñón. Todos estos datos sugieren que el uso de terapias anti-IL-17A podría ser una buena herramienta en el tratamiento de enfermedades renales con componente inflamatorio (figura 50).



**FIGURA 50. IL-17A potencial diana terapéutica en enfermedades renales con componente inflamatorio asociado a sobreexpresión de CTGF.**

Además de su participación en diversas nefropatías, IL-17A también aparece elevada en patologías cardiovasculares, destacando aterosclerosis experimental, aterosclerosis coronaria y síndrome coronario agudo (Barry SP 2010, Cheng X 2008, Briceño LG 2009). En pacientes con insuficiencia cardíaca se ha observado un aumento significativo de IL-17A respecto a sujetos sanos, además los pacientes que presentaban insuficiencia cardíaca de origen isquémico tenían mayores niveles plasmáticos de IL-17A que los no isquémicos lo que sugiere, un papel de IL-17A como potencial marcador inflamatorio en esta patología (Briceño LG 2009). Se ha demostrado que la IL-17A participa en la atracción y activación de macrófagos y en la infiltración de neutrófilos en aterosclerosis, e induce la apoptosis de cardiomiocitos (Liao YH 2012). Los resultados presentados en esta tesis muestran que CTGF *in vivo* induce la expresión de

IL-17A en aorta, principalmente localizada en células de músculo liso vascular, asociado a un aumento de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, y quimioquinas, como MCP-1 y RANTES. En modelos experimentales de daño vascular, el bloqueo de IL-17A, bien mediante el uso de anticuerpos neutralizantes o de adenovirus que expresan una forma soluble del receptor IL-17RAC, mostró efectos beneficiosos en la reducción de la lesión aterosclerótica inducida en ratones ApoE<sup>-/-</sup>, en la disminución de la hipertensión y la disfunción vascular en el modelo de Ang II y mejoró de la función cardíaca en un modelo de daño por isquemia (Erbel C 2009, Smith E 2010, Madhur MS 2010, Liao YH 2012). En ratas SHR la inhibición de IL-17R con un vector lentiviral mejoró la función sistólica y diastólica y la fibrosis miocárdica (Liu W 2011). En esta tesis hemos observado resultados similares en aorta, donde la neutralización de IL-17A disminuyó los niveles de citoquinas proinflamatorias inducidos por CTGF.

La principal causa de muerte de los enfermos crónicos renales, incluidos los que se encuentran en tratamiento en diálisis peritoneal, son los eventos cardiovasculares. Esta mayor incidencia no se atribuye a los factores de riesgo clásicos y está bien establecido que el daño renal influye en la predisposición al daño cardiovascular, lo que se ha denominado la conexión cardio-renal (Zoccali C 2011). Esta conexión sugiere la existencia de mecanismos y mediadores comunes implicados en la progresión de la enfermedad renal. Nuestros datos muestran que el CTGF *in vivo* induce una respuesta inflamatoria, mediada por el aumento de la síntesis de IL-17A en riñón y aorta, mostrando un mediador común que en el daño en ambos tejidos, renal y cardiovascular. La sobreexpresión de CTGF se ha descrito en ERC (Ito Y 1998, Gupta S 2000, Yokoi H 2002, Phanish MK 2010), en aterosclerosis (Cicha I 2005) y en el remodelado vascular (Kundi R 2009). Varios estudios independientes han propuesto que los niveles de CTGF (en plasma o en orina) podrían ser un buen biomarcador de riesgo cardiovascular en pacientes con nefropatía diabética y en otras ERC (Tam FW 2009, Nguyen TQ 2008, Gilbert RE 2003, Riser BL 2003) y para disfunción cardíaca en pacientes que muestran fibrosis miocárdica y fallo renal crónico (Koitabashi N 2008). Sin embargo, el empleo de CTGF como diana terapéutica podría tener efectos negativos ya que se ha observado su efecto protector a nivel cardíaco (Panek AN 2009, Ahmed MS 2011) y en algunos tipos de cáncer (Yang MH 2009). Todo esto indica que son necesarias otras opciones terapéuticas para bloquear las acciones de CTGF. Los datos presentados en esta tesis demuestran que el bloqueo de la IL-17A inhibe la inflamación renal y vascular causada por CTGF, sugiriendo que la IL-17A es una buena opción terapéutica. Además, hemos observado que otros factores implicados en la patología vascular y ERC, como son activación del SRA, aumento de AngII, hipertensión y diabetes, se asocian a aumento de los niveles renales de IL-17A. Estos datos apoyan la idea de que la activación de la respuesta Th17 local podría ser un mecanismo común en las patologías renales y cardiovasculares, y que el bloqueo de su citoquina efectora podría ser un buen abordaje terapéutico en estas patologías. Ensayos clínicos preliminares empleando un anticuerpo anti-IL-17A en pacientes con artritis reumatoide, psoriasis y uveítis han mostrado efectos beneficiosos bastante prometedores (Steinman 2010, Hueber W 2010,



Genovese MC 2010, Leonardi C 2012, Papp KA 2012). Por todo esto, nuestros resultados apoyan el uso de bloqueantes de IL-17A en el tratamiento de enfermedades inflamatorias renales y cardiovasculares.

### **3. EFECTO DEL BLOQUEO DE TGF- $\beta$ EN LAS ACCIONES DE CTGF.**

Muchos autores han hipotetizado que CTGF podría ser un mediador de las acciones profibróticas de TGF- $\beta$ 1 (Grotendorst, 1997, Mori T 1999, Ruiz-Ortega M 2002 y 2007, Rodríguez-Vita J 2008). Sin embargo, no está demostrado si fisiológicamente CTGF es un mediador, un co-activador o incluso un represor de TGF- $\beta$ 1. En células de *Xenopus* CTGF es capaz de unirse directamente a TGF- $\beta$ , a través del dominio rico en cisteína, actuando como un cofactor que potencia la unión de TGF- $\beta$  a sus receptores y la señalización a través de la vía Smad (Abreu JG 2002). Por el contrario, un estudio reciente ha demostrado que en células mesangiales el fragmento N-terminal de CTGF compite de forma directa con TGF- $\beta$ 1 por el sitio de unión a su receptor tipo III (endoglina) provocando la inhibición de la ruta Smad (O'Donovan HC 2012). Aunque está ampliamente demostrado que TGF- $\beta$ 1 induce la síntesis de CTGF (Grotendorst GR 1997, Mori T 1999, Ruiz-Ortega M 2002 y 2007, Rodríguez-Vita J 2008), se desconoce el efecto de CTGF sobre la síntesis de TGF- $\beta$ 1. Nuestros resultados muestran que CTGF induce un aumento transitorio del ARNm de TGF- $\beta$ , pero es incapaz de inducir la síntesis de TGF- $\beta$ 1 activo, tanto a nivel renal como vascular y, sin embargo, si produce una respuesta inflamatoria. En el modelo de infusión de Ang II nuestro grupo ha demostrado una inducción renal y vascular de CTGF a los 3 días, previa al aumento de la síntesis de TGF- $\beta$ 1 activo, que se observó a los 7 días (Carvajal G 2008, Rupérez M 2003, Rodríguez Díez R 2010, Sánchez-López E 2009b). Además la inducción de CTGF coincidía en el tiempo con una respuesta inflamatoria, mientras que el aumento de TGF- $\beta$ 1 se asoció a la aparición de fibrosis determinado por aumento en el depósito de colágenos. Estos resultados sugieren que CTGF *in vivo* podría participar en la inducción de una respuesta pro-inflamatoria o profibrótica dependiendo de la ausencia/presencia de TGF- $\beta$ 1.

Múltiples estudios han demostrado que TGF- $\beta$ 1 es un factor clave en la fibrosis renal (Bottinger EP 2007, Wang W 2005b, Eddy AA 2006). En pacientes con enfermedad renal y en diversos modelos de fibrosis experimental en riñón, se ha demostrado una asociación entre la elevada expresión renal de TGF- $\beta$ 1 y un aumento de la fibrosis, caracterizada por una acumulación excesiva de matriz extracelular, tanto en el glomérulo como en el intersticio (Yamamoto T 1996, Coimbra TM 1996, Gilbert RE, 1998, Hill C 2000, Shankland SJ 1996, Park IS 1997, Border WA 1997, Bottinger EP 2007). *In vitro*, TGF- $\beta$ 1 estimula la producción de proteínas de matriz extracelular e inhibe su degradación y es el factor más importante en la inducción de transición epitelio mesenquima de células túbuloepiteliales (Wang W 2005b, Eddy AA 2006). En ratones, la sobreexpresión de la forma activa de TGF- $\beta$ 1 en hígado causa fibrosis renal (Kopp JB 1996), sin embargo, la sobreexpresión sistémica de TGF- $\beta$  activo disminuye la inflamación renal en ratones con lupus eritematoso sistémico (Raz E 1995) y la sobreexpresión de la forma latente mejora tanto la inflamación como la fibrosis causada por obstrucción del uréter, y protege frente a la formación de semilunas en el modelo experimental de glomerulonefritis producida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular



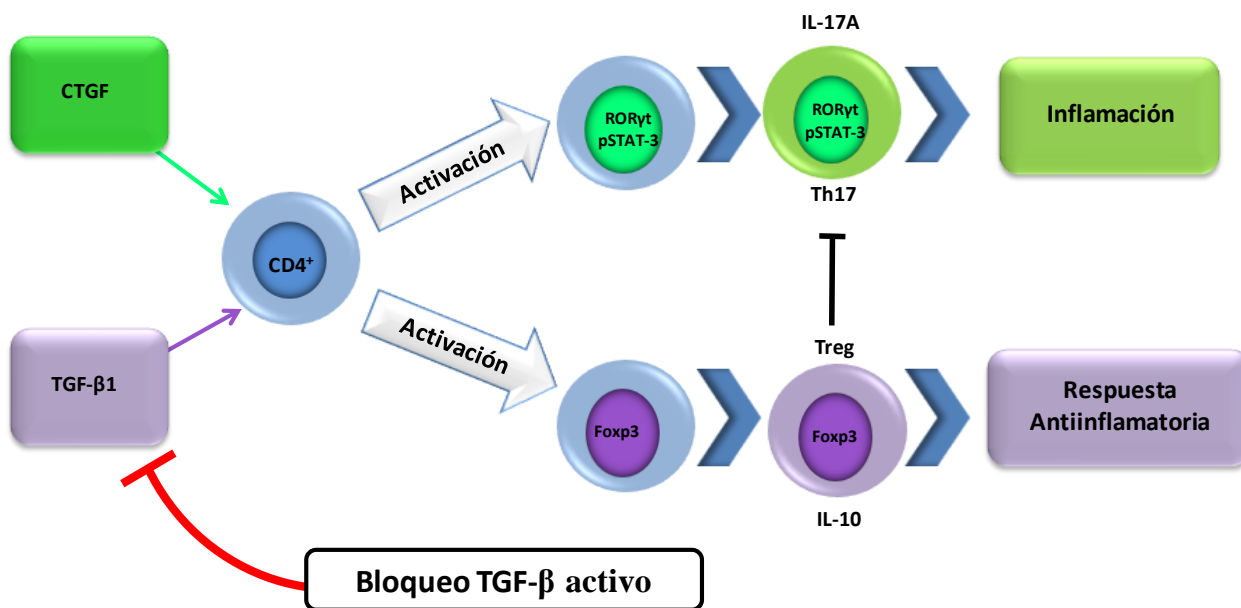
(Wang W 2005a, Huang XR 2008a y 2008b). Por otro lado, aunque el bloqueo de TGF- $\beta$ 1, empleando anticuerpos neutralizantes, ARNs antisentido o un secuestrador de la forma activa (decorina), bloquea la fibrosis *in vitro* y mejora la fibrosis renal en ratones con nefropatía diabética y en ratas con nefropatía experimental causada por puromicina; empeora la albuminuria y la proteinuria en estos modelos (Border WA 1997, Sharma K 1996, Ziyadeh FN 2000, Bottinger EP 2007, Ma LJ 2004). En el modelo del UUO, la delección condicional del receptor de TGF- $\beta$ 1 mejora la fibrosis túbulo-intersticial pero aumenta la inflamación renal (Meng XM 2011). En esta tesis hemos observado que la inhibición de TGF- $\beta$ 1, utilizando un anticuerpo neutralizante, incrementó la respuesta inflamatoria renal inducida por CTGF caracterizada por aumento significativo en los niveles de citoquinas proinflamatorias y de la presencia de macrófagos.

A nivel vascular TGF- $\beta$  participa en la patogénesis de muchas enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, reestenosis, aterosclerosis hipertrofia e insuficiencia cardíaca o formación de neointima (Ryan ST 2003, Ruiz Ortega M 2007). TGF- $\beta$  participa en la fibrosis vascular de forma directa induciendo la síntesis de matriz en células de músculo liso vascular bien de forma directa, o actuando como mediador de muchos agentes que participan en el daño cardiovascular, incluyendo el estrés mecánico, Ang II y altas concentraciones de glucosa (Ruiz Ortega M 2007). Sin embargo, en aterosclerosis la presencia de TGF- $\beta$ 1 tiene un efecto protector, ya que contribuye al mantenimiento de la estructura normal de vaso y controla el balance entre inflamación y acumulación de matriz extracelular. Aunque el bloqueo TGF- $\beta$  disminuye la fibrosis vascular en modelos experimentales de reestenosis y en ratas espontáneamente hipertensas (Ruiz Ortega M 2007), en modelos murinos de aterosclerosis, el bloqueo de TGF- $\beta$ 1 aceleró la formación de placa y su progresión hacia un fenotipo inestable (Mallat Z 2001, Lutgens E 2002, Robertson AK 2003, Grainger DJ 2004). En esta tesis, hemos observado que en aorta de ratones tratados con CTGF el bloqueo de TGF- $\beta$ 1 aumenta de forma significativa la expresión de citoquinas proinflamatorias. Nuestros resultados confirman los efectos perjudiciales de la inhibición de TGF- $\beta$ 1 en modelos de daño vascular asociados a inflamación.

Mientras que el papel fundamental de TGF- $\beta$ 1 en la fibrosis ha sido ampliamente reconocido, se ha prestado poca atención a la función del TGF- $\beta$ 1 como citoquina antiinflamatoria. Los ratones deficientes en el gen de TGF- $\beta$ 1 desarrollan una hiperinflamación generalizada que resulta letal y mueren antes de las 3-4 semanas de edad (Kulkarni AB 1993). La delección condicional en células T del gen de TGF- $\beta$ 1 o de su receptor TRII causa enfermedades autoinmunes (Qian X 2012). El aumento a nivel plasmático de TGF- $\beta$ 1, por administración o sobreexpresión, produce un efecto beneficioso en enfermedades de tipo inflamatorio, por ejemplo; inhibe la artritis erosiva (Chen W 1998), la encefalomiелitis autoinmune (Jin YX 2000) y reduce la insulinitis en ratones diabéticos no obesos (Piccirillo CA 1998). Parte de las acciones antiinflamatorias de TGF- $\beta$ 1 se atribuyen a su papel en la activación de la respuesta Treg (Zheng SG 2002). En pacientes con nefritis lúpica, se han observado bajos niveles de TGF- $\beta$ 1 y células Treg en sangre, comparados con los sujetos sanos (Xing Q 2012). En el modelo de infusión de Ang II la administración intravenosa de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) inhibe la infiltración de células inmunes y mediadores

proinflamatorios en tejido renal y vascular (Barhoumi T 2011). La inyección de células Treg inhibe el daño renal en glomerulonefritis experimental por anticuerpo anti-membrana basal (Wolf D 2005) y nefropatía inducida por adriamicina (Mahajan D 2006).

Varios estudios han asociado un desequilibrio Th17/Treg con diversas patologías, incluidos diversos tipos de cáncer (Zou W 2006). En pacientes urémicos que presentan eventos cardiovasculares adversos y en pacientes con síndrome coronario agudo se ha observado un aumento de células Th17 y de sus factores (IL-17, IL-6, IL-23 y ROR $\gamma$ t) y una disminución de células Treg y de los niveles de TGF- $\beta$ , IL-10 y Foxp3 (Zhang J 2010, Cheng X 2008). Efectos similares se han observado en modelos experimentales de aterosclerosis (Xie JJ 2010) y de trasplante renal asociado a mayor rechazo del injerto (Wang S 2008). En el modelo de administración de CTGF hemos observado que no se modifican los niveles renales de Foxp3, ni los niveles circulantes de células Treg, lo que sugiere que CTGF a diferencia de TGF- $\beta$  no regula la respuesta Treg. Sin embargo, el bloqueo de TGF- $\beta$ 1 en este modelo, disminuyó significativamente los niveles circulantes de células Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> y aumentó el número de linfocitos T citotóxicos. Estos resultados muestran el mecanismo responsable del aumento de la inflamación, y demuestran un efecto deletéreo del bloqueo de TGF- $\beta$  similar al hipotetizado por otros autores (Wolf D 2005, Mahajan D 2006) (figura 52).



**FIGURA 51. El bloqueo de TGF- $\beta$  inhibe su efecto antiinflamatorio favoreciendo la respuesta inflamatoria mediada por CTGF.**

#### 4. PAPEL DE LA RESPUESTA TH17 EN EL DAÑO PERITONEAL.

En general, después del inicio del tratamiento de cualquier tipo de diálisis, hemodiálisis (HD) o DP, los pacientes, incluso los estables, presentan una bajo grado de inflamación sostenida (Qureshi AR 2002

Libetta C 1996). Los pacientes en DP presentan una respuesta inflamatoria crónica y una función inmune alterada que se caracteriza por un aumento de los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , la proteína C reactiva o CXCL18, y del número de granulocitos y macrófagos, disminución de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y activación de las células T (Stenvinkel P 2006, Bellón T 2011), presentando, además, un marcado desequilibrio entre la respuesta Th1/Th2 (Zamauskaite A 1999, Libetta C 2011, Roberts GW 2009). Algunos estudios sugieren que los elevados niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias detectados en pacientes en diálisis se deben a la enfermedad renal crónica *per se* ya que no algunos pacientes no se observan diferencias entre los niveles séricos observados al inicio y los obtenidos tras años de tratamiento (Pereira BJ 1994). Sin embargo, existen estudios que difieren en este aspecto y sugieren que la reiteración en el tratamiento provoca un importante impacto en el estado inflamatorio crónico del paciente (Heberlin A 1991, Zemel D 1996). En pacientes urémicos en hemodiálisis se ha encontrado un desequilibrio entre la respuesta Treg/Th17 con un aumento de los niveles circulantes de IL-17A, especialmente en los pacientes con eventos cardiovasculares (Zhang J 2010). Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran, por primera vez, una activación de la respuesta Th17 en el peritoneo dañado de pacientes en DP. En el efluente de algunos de estos pacientes hemos detectado presencia de IL-17A. Cabe destacar que los niveles de IL-17A aumentaban de forma significativa en los pacientes que llevaban más de 3 años en tratamiento de DP. Además, el análisis de dos biopsias del mismo paciente, una obtenida en la etapa prediálisis, con una estructura de la membrana intacta, y otra obtenida tras 3 años de DP, con una marcada desestructuración de la membrana, mostró presencia de células IL-17A<sup>+</sup> solamente en la muestra tomada a los 3 años. En biopsias peritoneales de pacientes en DP hemos observado la presencia de células que expresan IL-17A, sobre todo en aquellos pacientes que presentaban un mayor infiltrado inflamatorio en la zona submesotelial. Entre las células IL-17A<sup>+</sup>, además de células con morfología linfocitaria (Th17), también hemos observado células de tipo mastocito y granulocitos, lo que indica que existen varios tipos celulares capaces de secretar IL-17A en el peritoneo. Estos resultados sugieren que la respuesta Th17, y su citoquina efectora IL-17A podría jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria crónica en el peritoneo de pacientes en DP.

La existencia de un modelo animal bien caracterizado, que permite emular el daño peritoneal causado exclusivamente por exposición a líquido de diálisis, sin tener en cuenta los efectos causados por la uremia, resulta de gran utilidad para la profundización en el estudio de las distintas respuestas implicadas en este proceso (González-Mateo GT 2008). Los experimentos realizados en el modelo experimental en ratón nos permitieron demostrar que la exposición continua de la membrana peritoneal a líquido de diálisis daba lugar a una respuesta Th17 local. Cabe destacar que la exposición diaria del peritoneo a líquido de diálisis indujo la presencia de células infiltrantes en la zona submesotelial al cabo de tan solo 7 días. A este tiempo, se observaron células CD4<sup>+</sup>, que expresaban IL-17A (Th17) junto con un aumento de IL-6, la citoquina inductora de la respuesta Th17, y de los factores de transcripción

relacionados con la activación de esta respuesta, ROR $\gamma$ t y STAT-3 (Ivanov II 2006, Mathur AN 2007, Das J 2009). La sobreexpresión peritoneal de IL-17A se mantuvo hasta los 30 días de instilación, lo que indica una activación sostenida de la respuesta Th17.

Aunque en pacientes en DP se ha observado una desregulación de las respuesta Th1/Th2 (Zamauskaite A 1999, Roberts GW 2009, Libetta C 2011) en el modelo experimental, la instilación con líquido de diálisis no modificó los niveles peritoneales de las citoquinas clave de las respuestas inflamatorias Th1/Th2 (INF- $\gamma$  e IL-4, respectivamente). Estos resultados sugieren que la respuesta Th17 estaría causada directamente por la exposición al líquido, mientras que las otras respuestas podrían deberse al estado urémico de los pacientes. No obstante, sería necesario realizar más experimentos que nos permitieran confirmar esta hipótesis.

En el modelo experimental hemos observado un aumento local de quimioquinas asociado a la activación respuesta Th17, y un engrosamiento de la membrana que se correlacionaba con el aumento en la cavidad peritoneal de los niveles de IL-17A. Además, hemos demostrado que la administración intraperitoneal de IL-17A en ratones sanos causó la aparición de infiltrado inflamatorio y aumento la expresión de citoquinas proinflamatorias, profibróticas y proangiogénicas. El proceso reiteado de diálisis da lugar a un deterioro de la función peritoneal, por activación de las células de la membrana peritoneal que inducen la liberación de citoquinas y factores de crecimiento. En los estudios *in vitro*, realizados en células mesoteliales humanas en cultivo, la estimulación con IL-17A recombinante indujo la expresión génica de mediadores pro-inflamatorios y pro-fibróticos. Estos resultados demuestran que IL-17A contribuye al proceso de daño peritoneal al activar a las células mesoteliales, actuando como un mediador de la respuesta inflamatoria y como posible inductor de fibrosis y angiogénesis (figura 52).

Existen pocos datos sobre los efectos de la inhibición de la respuesta Th17 en el daño peritoneal. En un modelo de peritonitis inducida por zimosan en ratones obesos (ob/ob) se observó que la inhibición de IL-17A, utilizando un anticuerpo neutralizante, inhibe la infiltración de neutrófilos y la sobreexpresión de las quimioquinas CXCL1 y CXCL2 (Pini M 2010). En nuestro modelo, el bloqueo de IL-17A inhibió la respuesta inflamatoria peritoneal inducida por instilación con líquido de diálisis, disminuyendo el componente celular inflamatorio. Estos resultados sugieren que bloqueo de IL-17A podría ser una alternativa terapéutica para la prevención del daño peritoneal causado por la exposición reiterada al líquido de diálisis.

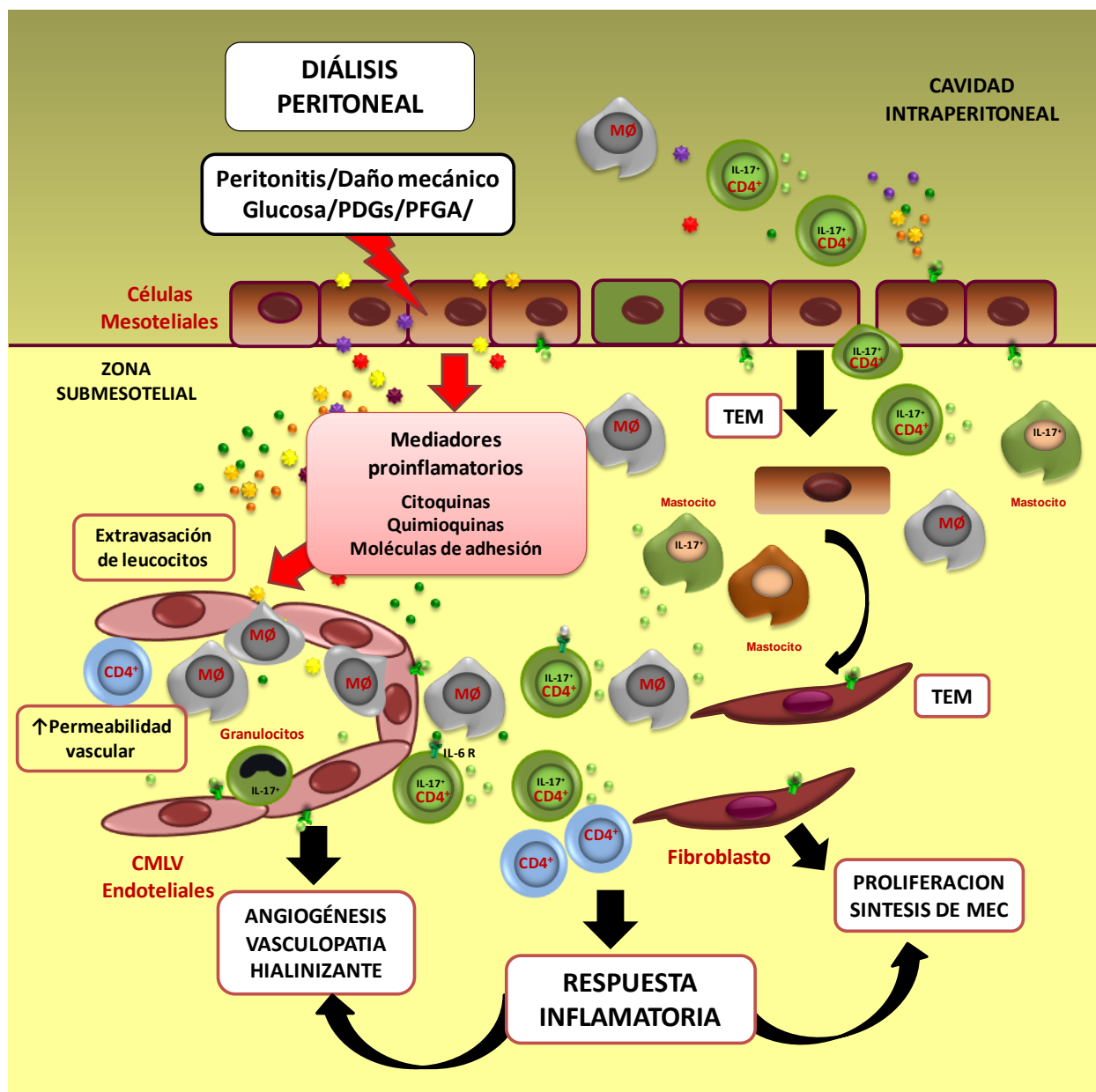


FIGURA 52. IL-17A participa en el daño peritoneal causado por exposición reiterada a líquido de diálisis.





## ***VI. CONCLUSIÓN***





**CONCLUSIONES:**

1. En diversos modelos de daño renal no inmune, incluidos administración sistémica de CTGF, infusión de Ang II, hipertensión y nefropatía diabética hemos observado un aumento de la producción renal de IL-17A asociado la presencia de infiltrado inflamatorio. El modelo experimental de daño CTGF, que presenta una respuesta inflamatoria sostenida en el riñón, hemos demostrado activación local de los factores que regulan la respuesta Th17 (IL-6, ROR $\gamma$ t y STAT-3, y un aumento en la producción renal de IL-17A tanto por linfocitos Th17 infiltrantes como por células residentes renales, principalmente túbuloepiteliales.
2. En biopsias renales de pacientes con nefropatía diabética se observó tinción positiva de IL-17A en zonas con alto componente inflamatorio.
3. El bloqueo de la respuesta Th17, mediante un anticuerpo neutralizante de su citoquina efectora, IL-17A, disminuyó la respuesta inflamatoria observada en dos modelos experimentales de daño renal no inmune, daño mediado por CTGF y obstrucción unilateral del uréter.
4. El conjunto de estos datos demuestran un aumento de la producción local de IL-17A en diversas patologías renales experimentales y humanas, no inmunes, todas ellas caracterizadas por un elevado componente inflamatorio.
5. El modelo de administración sistémica de CTGF genera una respuesta inflamatoria renal y vascular que se inhibe al bloquear IL-17A, sugiriendo un mecanismo común que podría ayudar a comprender la conexión cardio-renal.
6. En biopsias peritoneales, de pacientes con enfermedad renal sometidos a diálisis peritoneal, se observó tinción positiva de IL-17A asociada a la presencia de componente inflamatorio.
7. El modelo experimental de daño peritoneal causado por la exposición reiterada a líquidos de diálisis presentó activación de la respuesta Th17 en el peritoneo. El bloqueo de IL-17A disminuyó el infiltrado inflamatorio peritoneal. La IL-17A *in vivo* e *in vitro* reguló la expresión de genes proinflamatorios, profibróticos y proangiogénicos en el peritoneo. Todo esto demuestra la contribución de IL-17A al daño peritoneal.

Los resultados de esta tesis demuestran que el bloqueo de la IL-17A podría ser una nueva terapia para el tratamiento de los enfermos con patologías renales crónicas, incluidas las complicaciones asociadas a la diálisis peritoneal.





## ***VII. BIBLIOGRAFÍA***



- Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective tissue growth factor (CTGF) modulates cell signaling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002; 275:15220-5.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007;8(9):942-9
- Ahmed MS, Gravning J, Martinov VN, von Lueder TG, Edvardsen T, Czibik G, Moe IT, Vinge LE, Øie E, Valen G, Attramadal H. Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Apr;300(4):H1291-302.
- Ahmed MS, Øie E, Vinge LE, Yndestad A, Andersen GØ, Andersson Y, Attramadal T, Attramadal H. Connective tissue growth factor—a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats. *J Mol Cell Cardiol* 36: 393– 404, 2004.
- Ahmed MS, von Lueder TG, Øie E, Kjekshus H, Attramadal H. Induction of myocardial connective tissue growth factor in pacing-induced heart failure in pigs. *Acta Physiol Scand* 184: 27– 36, 2005.
- Alcázar R, Egocheaga MI, Orte L, Lobos JM, González Parra E, Alvarez Guisasola F, Górriz JL, Navarro JF, Martín de Francisco AL. SEN-SEMFYC consensus document on chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2008; 28(3):273-82.
- Anders HJ, Sayyed SA, Vielhauer V. Questions about chemokine and chemokine receptor antagonism in renal inflammation. *Nephron Exp Nephrol.* 2010; 114(2):e33-8.
- Arababadi MK, Nosratabadi R, Hassanshahi G, Yaghini N, Pooladvand V, Shamsizadeh A, Hakimi H, Derakhshan R. Nephropathic complication of type-2 diabetes is following pattern of autoimmune diseases? *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87(1):33-7.
- Ares-Carrasco S, Picatoste B, Benito-Martín A, Zubiri I, Sanz AB, Sánchez-Niño MD, Ortiz A, Egido J, Tuñón J, Lorenzo O. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297(6):H2109-19.
- Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Selgas R, López-Cabrera M. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(7):2004-13.
- Aroeira LS, Loureiro J, González-Mateo GT, Fernandez-Millara V, del Peso G, Sánchez-Tomero JA, Ruiz-Ortega M, Bajo MA, López-Cabrera M, Selgas R. Characterization of epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells in a mouse model of chronic peritoneal exposure to high glucose dialysate. *Perit Dial Int.* 2008;28 Suppl 5:S29-3
- Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Bioley G, Valmori D. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the TH17 lineage-specific transcription factor RORγt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 8635–8640.

- Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, Paradis P, Schiffrin EL. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*. 2011;57(3):469-76.
- Barry SP, Ounzain S, McCormick J, Scarabelli TM, Chen-Scarabelli C, Saravolatz LI, Faggian G, Mazzucco A, Suzuki H, Thiernemann C, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. Enhanced IL-17 signalling following myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol*. 2011;
- Bataller R, Brenner D. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209–218.
- Bellón T, Martínez V, Lucendo B, del Peso G, Castro MJ, Aroeira LS, Rodríguez-Sanz A, Ossorio M, Sánchez-Villanueva R, Selgas R, Bajo MA. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Sep; 26(9):2995-3005.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27: 20-21.
- Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, Hafler DA. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 2009; 113: 4240–4249.
- Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792(10):954-73.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441(7090):235-8.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK: Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453(7198):1051-7.
- Blaney- Davidson EN, Vitters EL, Mooren FM, Oliver N, Berg WB, van der Kraan PM. Connective tissue growth factor/CCN2 overexpression in mouse synovial lining results in transient fibrosis and cartilage damage. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(5):1653-61.
- Blank U, Essig M, Scanduzzi L, Benhamou M, Kanamaru Y. Mast cells and inflammatory kidney disease. *Immunol Rev*. 2007;217:79-95.
- Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol*. 2002; 21:473– 482.
- Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Haberberger T, Kelly M, Robertson J, Gauldie J: Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 168:770–778.
- Border WA and Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 1997; 51: 1388–1396.

- Border WA, Noble NA. Evidence that TGF-beta should be a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1998; 54: 1390-1.
- Border WA, Noble NA: Interactions of transforming growth factor-b and angiotensina II in renal fibrosis. *Hypertension.* 1998; 31:181-188.
- Bottinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol.* 2007; 27: 309-20.
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol.* 1991 Sep;114(6):1285-94.
- Brauner A, Lu Y, Hallden G, Hylander B, Lundahl J. Difference in the blood monocyte phenotype between uremic patients and healthy controls: its relation to monocyte differentiation into macrophages in the peritoneal cavity. *Inflammation* 1998; 22:55–66.
- Briceño LG, Alfieri AB, Briceño AB, Fagasso G. Los niveles plasmáticos de citocinas inflamatorias están elevados en pacientes con insuficiencia cardiaca. *Revista Latinoamericana de Hipertensión* 2009. Vol. 4 (4)105-109.
- Brigstock DR. Strategies for blocking the fibrogenic actions of connective tissue growth factor (CCN2): From pharmacological inhibition in vitro to targeted siRNA therapy in vivo. *J Cell Commun Signal.* 2009; 3(1):5-18.
- Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev.* 1999 Apr;20(2):189-206.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27: 68-73
- Burns WC, Twigg SM, Forbes JM, Pete J, Tikellis C, Thallas-Bonke V, et al. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(9):2484-94.
- Butcher MJ, Gjurich BN, Phillips T, Galkina EV. The IL-17A/IL-17RA axis plays a proatherogenic role via the regulation of aortic myeloid cell recruitment. *Circ Res.* 2012 Mar 2;110(5):675-87.
- Campos PP, Bakhle YS, Andrade SP. Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair Regen.* 2008;16(3):416-24.
- Carvajal G, Rodríguez-Vita J, Rodríguez-Díez R, Sánchez-López E, Rupérez M, Cartier C, Esteban V, Ortiz A, Egido J, Mezzano SA, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int.* 2008 Sep;74(5):585-95.
- Chang SH, Park H, Dong C. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:35603–35607

- Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a STAT-3-dependent manner. *Science*. 2009; 326(5955):986-91.
- Cheever AW, Dunn MA, Dean DA, Duvall RH. Differences in hepatic fibrosis in ICR, C3H, and C57BL/6 mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(6):1364-9.
- Chen L, Liu BC, Zhang XL, Zhang JD, Liu H, Li MX. Influence of connective tissue growth factor antisense oligonucleotide on angiotensin II-induced epithelial mesenchymal transition in HK2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 2007;27:1029–1036.
- Chen S, Crother TR, Arditi M. Emerging role of IL-17 in atherosclerosis. *J Innate Immun*. 2010; 2(4):325-33.
- Chen W, Jin W, Cook M, Weiner HL, Wahl SM. Oral delivery of group A streptococcal cell walls augments circulating TGF-beta and suppresses streptococcal cell wall arthritis. *J Immunol* 1998; 161: 6297-6304,
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003; 198(12):1875-86.
- Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, Yao R, Chen Y, Liao YH. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2008; 127(1):89-97.
- Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 1987 Nov 1;166(5):1229-44.
- Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2000; 58:353–62.
- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia* 2007; 50: 471– 480,
- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int* 2006; 69:73–80.
- Chung AC, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011 May; 22(5):802-9.
- Chung BH, Kim KW, Sun IO, Choi SR, Park HS, Jeon EJ, Kim BM, Choi BS, Park CW, Kim YS, Cho ML, Yang CW. Increased interleukin-17 producing effector memory T cells in the end-stage renal disease patients. *Immunol Lett*. 2012 Jan 30;141(2):181-9. .
- Chung BH, Lee JY, Kang SH, Sun IO, Choi SR, Park HS, Kim JI, Moon IS, Shin YS, Park JH, Park CW, Yang CW, Kim YS, Choi BS. Comparison of patient outcome according to renal replacement modality after renal allograft failure. *Ren Fail*. 2011;33(3):261-8.



- Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, Chitnis T, Grusby MJ, Sayegh MH, Tzianabos AO. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003 Feb 15; 170(4):1958-63.
- Cicha I, Yilmaz A, Klein M, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(5):1008-101.
- Coimbra TM, Carvalho J, Fattori A, Da Silva CG, and Lachat JJ. Transforming growth factor-beta production during the development of renal fibrosis in rats with subtotal renal ablation. *Int J Exp Pathol* 1996; 77: 167–173.
- Crispin JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol* 2008; 181: 8761–8766.
- Cruz DN, Bagshaw SM. Heart-kidney interaction: epidemiology of cardiorenal syndromes. *Int J Nephrol*. 2010 Dec 29;2011:351291.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421: 744–748.
- Das J, Ren G, Zhang L et al. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J Exp Med* 2009; 206: 2407–2416.
- Daugherty A, Rateri DL. T lymphocytes in atherosclerosis: the yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circ Res*. 2002; 90(10):1039-40.
- Davies SJ, Bryan J, Phillips L, Russell GI. Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. *Nephrol Dial Transplant*. 1996 Mar;11(3):498-506.
- Davies SJ, Suassuna J, Ogg CS, Cameron JS. Activation of immunocompetent cells in the peritoneum of patients treated with CAPD. *Kidney Int* 1989; 36:661–8.
- De Winter P, Leoni P, Abraham D. Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors* 2008; 26:80-91.
- Dendooven A, Gerritsen KG, Nguyen TQ, Kok RJ, Goldschmeding R. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) ELISA: a novel tool for monitoring fibrosis. *Biomarkers*. 2011 J;16(4):289-301.
- Di Paolo N, Sacchi G. Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int* 2000; 20 Suppl 3:37-63.
- Dong X, Bachman LA, Miller MN, Nath KA, Griffin MD. Dendritic cells facilitate accumulation of IL-17 T cells in the kidney following acute renal obstruction. *Kidney Int*. 2008; 74(10):1294-309.
- Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2964–66.
- Egwuagu CE. STAT-3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* 2009; 47:149–156.

- Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo SF, Ranjbaran H, Gallo A, Sokol SI, Pfau S, Pober JS, Tellides G. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2009 Mar 17;119(10):1424-32.
- Erbel C, Chen L, Bea F, Wangler S, Celik S, Lasitschka F, Wang Y, Böckler D, Katus HA, Dengler TJ. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol* 2009; 183(12):8167-8175.
- Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jun;15(6):1514-29.
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*. 2004; 172(9):5149-53.
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman, Dalton D, Fathman CG: Mice with a disrupted IFN- $\gamma$  gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 1996; 156: 5–7.
- Ferenbach D, Kluth D, Hughes J. Inflammatory cells in renal injury and repair. *Semin Nephrol* 2007; 27: 250–259.
- Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 2593–2603.
- Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol*. 1996 Sep;107(3):404-1.
- Fujinaka H, Yamamoto T, Takeya M, Feng L, Kawasaki K, Yaoita E, Kondo D, Wilson CB, Uchiyama M, Kihara I. Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1174–1178.
- Gaffen SL: Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9:556–567, 2009
- Gagliardini E, Benigni A. Role of anti-TGF-beta antibodies in the treatment of renal injury. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006 Feb-Apr;17(1-2):89-96
- Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol Rev*. 1989 Oct;111:79-110.
- Galliera E, Corsi MM, Bonecchi R, Locati M, Mantovani A: Chemokines as pharmacological targets. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8:638–646.

- Gan PY, Steinmetz OM, Tan DS, O'Sullivan KM, Ooi JD, Iwakura Y, Kitching AR, Holdsworth SR: Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 21: 925–931, 2010
- Gao RP, Brigstock DR. Connective tissue growth factor hammerhead ribozyme attenuates human hepatic stellate cell function. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(30):3807-13.
- Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P, Sloan-Lancaster J. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 929–939.
- Gilbert RE, Akdeniz A, Weitz S, Usinger WR, Molineaux C, Jones SE, Langham RG, Jerums G.. Urinary connective tissue growth factor excretion in patients with type 1 diabetes and nephropathy. *Diabetes Care* 2003;26(9):2632-2636.
- Gilbert RE, Cox A, Wu LL, Allen TJ, Hulthen UL, Jerums G, Cooper ME. Expression of transforming growth factor $\beta$ 1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. *Diabetes* 1998;47:414–422,.
- Girndt M, Sester U, Sester M, Kaul H, Köhler H. Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Dec;14(12):2807-10.
- Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004; 351(13):1296-305.
- González-Mateo GT, Loureiro-Alvarez J, Rayego-Mateos S, Ruiz-Ortega M, López-Cabrera M, Selgas R, Aroeira LS. Animal models of peritoneal dialysis: relevance, difficulties, and future. *Nefrología*. 2008; 28 Suppl 6:17-22.
- Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(3):399-404.
- Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- $\beta$  action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Sep; 8(3):171-9
- Guha M, Xu ZG, Tung D, Lanting L, Natarajan R. Specific down-regulation of connective tissue growth factor attenuates progression of nephropathy in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *FASEB J*. 2007; 21:3355-3368,
- Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 2001; 59: 415–424.
- Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 2000; 58(4):1389-99.
- Hamada H, Garcia-Hernandez M de L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, Cooper AM, Swain SL, Dutton RW. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol*. 2009 Mar 15;182(6):3469-81.

- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6(11):1123-32
- Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2006 Dec;17(8):699-706.
- Heberlin A, Urena P, Nguyen AT, Zingraff J, Descamps-Latscha B. Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1991; 39:954–60.
- Hewitson G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest*. 2006; 116(2):288-96.
- Hewitson TD. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 296(6):F1239-44.
- Hill C, Flyvbjerg A, Gronbaek H, Petrik J, Hill DJ, Thomas CR, Sheppard MC, Logan A. The renal expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats. *Endocrinology* 141: 1196–1208, 2000.
- Hills CE, Squires PE. The role of TGF- $\beta$  and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(3):131-9.
- Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson VL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM, Malech HL, Gallin JI, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schäffer AA, Puck JM, Grimbacher B. STAT-3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med*. 2007; 357:1608-1619.
- Hoshijima M, Hattori T, Inoue M, Araki D, Hanagata H, Miyauchi A, Takigawa M. CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *FEBS Lett* 2006;580:1376-82.
- Huang XR, Chung AC, Wang XJ, Lai KN, Lan HY. Mice overexpressing latent TGF-beta1 are protected against renal fibrosis in obstructive kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295(1):F118-27.
- Huang XR, Chung AC, Zhou L, Wang XJ, Lan HY. Latent TGF-beta1 protects against crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19(2):233-42.
- Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, Antoni C, Draelos Z, Gold MH; Psoriasis Study Group, Durez P, Tak PP, Gomez-Reino JJ; Rheumatoid Arthritis Study Group, Foster CS, Kim RY, Samson CM, Falk NS, Chu DS, Callanan D, Nguyen QD; Uveitis Study Group, Rose K, Haider A, Di Padova F. Effects of AIN457, a Fully Human Antibody to Interleukin-17A, on Psoriasis, Rheumatoid Arthritis, and Uveitis. *Sci Transl Med* 2010;2(52):52ra72.
- Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Bräuer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2004; 199: 303-313.

- Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, Goldschmeding R. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53:853-61.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR.. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126:1121-33.
- Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 2003; 130:2779–2791
- Iyoda M, Shibata T, Kawaguchi M, Hizawa N, Yamaoka T, Kokubu F, Akizawa T: IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: Synergy with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;298: F779–F787.
- J. Egido, M. Ruiz-Ortega, E. González-Parra, L. Rico Zalba, B. Fernández-Fernández, B. Mallavia, A. Ortiz, C. Gómez-Guerrero. Tratamiento de la nefropatía diabética: más allá del bloqueo del sistema renina-angiotensina. *Nefrología Sup Ext* 2011;2(5):77-84
- J. Egido, M. Ruiz-Ortega, E. González-Parra, L. Rico Zalba, B. Fernández-Fernández, B. Mallavia, A. Ortiz, C. Gómez-Guerrero. Tratamiento de la nefropatía diabética: más allá del bloqueo del sistema renina-angiotensina. *Nefrología Sup Ext* 2011;2(5):77-8
- Jedsadayanmata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SC. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3). *J Biol Chem* 1999; 274:24321-7.
- Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004; 114: 1198-1208.
- Jin YX, Xu LY, Guo H, Ishikawa M, Link H, Xiao BG. TGF- $\beta$ 1 inhibits protracted-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by activating dendritic cells. *J Autoimmun* 2000; 14:213-220.
- Jonuleit H, Scmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323-6327.
- Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012 Apr 23;30:531-64.
- Kanamori H, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Nagai K, Takahashi T, Abe H, Iehara N, Fukatsu A, Okamoto H, Kita T, Doi T, Arai H. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 772–777.
- Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF- $\beta$  receptor function. *Trends Cell Biol*. 2009; 19, 385–394

- Karger A, Fitzner B, Brock P, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells. *Cell Signal*. 2008; 20(10):1865-72.
- Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ: Discovery and biology of IL-23 and IL-27: Related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 221–242,
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF-beta receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 6: 1365–1375.
- Kawaguchi M, Kokubu F, Odaka M, Watanabe S, Suzuki S, Ieki K, Matsukura S, Kurokawa M, Adachi M, Huang SK. Induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by a new cytokine, ML-1 (IL-17F), via Raf I-MEK-ERK pathway. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Aug;114(2):444-50.
- Khalil N. TGFbeta from latent to active. *Microbes Infect* 1999; 1: 1255–1263.
- Kilshaw P, Brent L, Pinto M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature* 1975; 255: 489-491
- Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12981-6.
- Kitching AR, Holdsworth SR. The Emergence of Th17 Cells as Effectors of Renal Injury. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(2):235-238.
- Kitching AR, Turner AL, Semple T, Li M, Edgton KL, Wilson GR, Timoshanko JR, Hudson BG, Holdsworth SR: Experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis: A protective role for IFN-gamma. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1764– 1774,
- Koitabashi N, Arai M, Niwano K, Watanabe A, Endoh M, Suguta M, Yokoyama T, Tada H, Toyama T, Adachi H, Naito S, Oshima S, Nishida T, Kubota S, Takigawa M, Kurabayashi M.. Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008;10(4):373-9,
- Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):467-76
- Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest*. 1996; 74: 991-1003.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.
- Kryczek I, Wu K, Zhao E, Wei S, Vatan L, Szeliga W, Huang E, Greenson J, Chang A, Roliński J, Radwan P, Fang J, Wang G, Zou W. IL-17+ Regulatory T Cells in the Microenvironments of Chronic Inflammation and Cancer. *J Immunol* 2011; 186:4388-4395;

- Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C. The CCN family: a new class of inflammation modulators? *Biochimie*. 2011 Mar;93(3):377-88.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 770-774.
- Kundi R, Hollenbeck ST, Yamanouchi D, Herman BC, Edlin R, Ryer EJ, Wang C, Tsai S, Liu B, Kent KC. Arterial gene transfer of the TGF-beta signalling protein Smad3 induces adaptive remodelling following angioplasty: a role for CTGF. *Cardiovasc Res*. 2009 Nov 1;84(2):326-35.
- Laan M, Lötvall J, Chung KF, Lindén A. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. *Br J Pharmacol*. 2001;133(1):200-6.
- Lai KN, Lai KB, Lam CW, Chan TM, Li FK, Leung JC. Changes of cytokines profile during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:644–52.
- Lai KN, Leung JC. Inflammation in peritoneal dialysis. *Nephron Clin Pract*. 2010; 116(1):c11-8.
- Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res*. 1999; 248:44–57.
- Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential extracellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*. 2006 Dec 1;119(Pt 23):4803-10.
- Leask A, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2002 Apr;4(2):136-42.
- Leask A, Parapuram SK, Shi-Wen X, et al. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J Cell Commun Signal* 2009;3:89–94.
- Lee HM, Bautista JL, Hsieh CS. Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2011;112:25-71
- Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney International* 2010; 78 (Suppl 119), S22–S26.
- Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med* 2012;366:1190-9.
- Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, Strieter RM, Rosin DL, Okusa MD. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2010;120(1):331-42.
- Liao YH, Xia N, Zhou SF, Tang TT, Yan XX, Lv BJ, Nie SF, Wang J, Iwakura Y, Xiao H, Yuan J, Jevallée H, Wei F, Shi GP, Cheng X. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Jan 24;59(4):420-9.
- Libetta C, De Nicola L, Rampino T, De Simone W, Memoli B. Inflammatory effects of peritoneal dialysis: evidence of systemic monocyte activation. *Kidney Int*. 1996 Feb;49(2):506-11.



- Libetta C, Esposito P, Sepe V, Guastoni C, Zucchi M, Meloni F, Dal Canton A. Effects of different peritoneal dialysis fluids on the TH1/TH2 balance. *Eur Cytokine Netw.* 2011 Mar;22(1):24-31.
- Linden A. A role for the cytoplasmic adaptor proteins Act1 in mediating IL-17 signaling. *Sci. STKE* 2007;re4:1–8.
- Liu W, Wang X, Feng W, Li S, Tian W, Xu T, Song Y, Zhang Z. Lentivirus mediated IL-17R blockade improves diastolic cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *Exp Mol Pathol.* 2011;91(1):362-7.
- Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Feb;21(2):212-22. Epub 2009 Dec 17.
- Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 2002; 197: 322–332.
- López-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, del Peso G, Sánchez-Tomero JA, Selgas R. Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int.* 2006 Jan-Feb;26(1):26-34.
- Loverre A, Tataranni T, Castellano G, Divella C, Battaglia M, Ditunno P, Corcelli M, Mangino M, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2011; 11(6):1248-59.
- Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliansky VE, Daemen MJ: Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(6):975-82,
- Ma LJ, Jha S, Ling H, Pozzi A, Ledbetter S, Fogo AB. Divergent effects of low versus high dose anti-TGF-beta antibody in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Kidney Int* 2004; 65:106 –115,
- Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 2010 Feb;55(2):500-7.
- Mahajan D, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Wang YM, Alexander SI, Harris DC. CD4+CD25+ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Oct;17(10):2731-41.
- Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A: Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 2001;89(10):930-4,
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT: Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441:231–234.



- Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA, Kelly MM. Transient overexpression of TGF- $\beta$ 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Feb;16(2):425-36.
- Masson, P. Some histological methods; trichrome stainings and their preliminary technique. *J. Tech. Methods*, 1929, 12, 75-90.
- Matas AJ, Simmons RL, Kjellstrand CM, Buselmeier TJ, Najarian JS. Increased incidence of malignancy during chronic renal failure. *Lancet* 1975; 1: 883–886.
- Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, Kapur R, Levy DE, Kansas GS, Kaplan MH. STAT-3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol* 2007;178:4901–4907.
- Matsumoto K, Kanmatsuse K. Increased urinary excretion of interleukin-17 in nephrotic patients. *Nephron*. 2002;91(2):243-9.
- Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010; 375: 2073–2081
- Meng XM, Huang XR, Xiao J, Chen HY, Zhong X, Chung AC, Lan HY. Diverse roles of TGF- $\beta$  receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro. *J Pathol*. 2011 Dec 21. doi: 10.1002/path.3976.
- Mezzano S, Aros C. Chronic kidney disease: classification, mechanisms of progression and strategies for renoprotection. *Rev Med Chil*. 2005 Mar;133(3):338-48.
- Mezzano SA, Barría M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Flores C, Egido J. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int*. 2001; 60(4):1366-77..
- Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, Wong CH, Schneider E, Dy M, Leite-de-Moraes MC. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):995-1001.
- Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2008;452:773-776.
- Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant negative mutations in the DNA-binding domain of STAT-3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2007; 448:1058-1062
- Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009 Aug 27;361(9):888-98.
- Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999;181:153–159

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145–73.
- Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab.* 2000 Sep-Oct;71(1-2):276-92.
- Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFβ signal transduction *Development* 2009; 136, 3699–3714
- Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317: 256–260.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003; 198: 1951–1957.
- Nguyen TQ, Tarnow L, Jorsal A, Oliver N, Roestenberg P, Ito Y, Parving HH, Rossing P, van Nieuwenhoven FA, Goldschmeding R.. Plasma connective tissue growth factor is an independent predictor of end-stage renal disease and mortality in type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2008;31(6):1177-1182
- Nogueira E, Hamour S, Sawant D, Henderson S, Mansfield N, Chavele KM, Pusey CD, Salama AD. Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(7):2209-17.
- O'Donovan HC, Hickey F, Brazil DP, Kavanagh DH, Oliver N, Martin F, Godson C, Crean J. Connective tissue growth factor antagonizes transforming growth factor-β1/Smad signalling in renal mesangial cells. *Biochem J.* 2012;441(1):499-510.
- Ohshima K, Mogi M, Jing F, Iwanami J, Tsukuda K, Min LJ, Higaki J, Horiuchi M. Roles of interleukin 17 in angiotensin II type 1 receptor-mediated insulin resistance. *Hypertension.* 2012;59(2):493-9.
- Oklu R, Hesketh R. The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J.* 2000; 352: 601–610.
- Ooi JD, Phoon RK, Holdsworth SR, Kitching AR: IL-23, not IL-12, directs autoimmunity to the Goodpasture antigen. *J Am Soc Nephrol* 2009;20: 980–989,
- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):454-67.
- Panek AN, Posch MG, Alenina N, Ghadge SK, Erdmann B, Popova E, Perrot A, Geier C, Dietz R, Morano I, Bader M, Ozcelik C. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS One.* 2009 Aug 25;4(8):e6743

- Panzer U, Schneider A, Wilken J, Thompson DA, Kent SB, Stahl RA. The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 56: 2107–2115.
- Panzer U, Steinmetz OM, Stahl RA, Wolf G: Kidney diseases and chemokines. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 65–80.
- Papanicolaou DA, Vgontzas AN. Interleukin-6: The endocrine cytokine. *J Clin Endocrin Metab* 2000; 85: 1331–1333,
- Papp KA, Leonardi C, Menter A, et al. Brodalumab, an anti-interleukin-17–receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 2012; 366:1181-9.
- Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, Ouyang W, Hu Y. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol*. 2010; 30(2):185-95.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1133-41.
- Park IS, Kiyomoto H, Abboud SL, Abboud HE. Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1997 46: 473–480.
- Paust HJ, Turner JE, Steinmetz OM, Peters A, Heymann F, Hölscher C, Wolf G, Kurts C, Mittrücker HW, Stahl RA, Panzer U. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 969–979.
- Pecoits-Filho R, Araújo MR, Lindholm B, Stenvinkel P, Abensur H, Romão JE Jr, Marcondes M, De Oliveira AH, Noronha IL. Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Aug;17(8):1480-6.a
- Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 11:28-31b
- Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Wang AY, Heimbürger O, Lindholm B. Chronic inflammation in peritoneal dialysis: the search for the holy grail? *Perit Dial Int*. 2004 Jul-Aug;24(4):327-39.
- Perbal B, Takigawa M: CCN proteins: a new family of cell growth and differentiation regulators. Imperial College Press, London UK; 2005.
- Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 2004; 363:62-4.
- Perbal B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Mol Pathol*. 2001 Apr;54(2):57-79.
- Perbal B. The CCN family of genes: a brief history. *Mol Pathol*. 2001 Apr;54(2):103-4.
- Pereira BJ, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int* 1994; 45:890–6.

- Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)-a marker mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* 2010;114: e83-92.
- Piccirillo CA, Chang Y, Prud'homme GJ: TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1998; 161: 3950 –3956.
- Pietrowski E, Bender B, Huppert J, White R, Luhmann HJ, Kuhlmann CR. Pro-inflammatory effects of interleukin-17A on vascular smooth muscle cells involve NAD(P)H- oxidase derived reactive oxygen species. *J Vasc Res.* 2011;48(1):52-8
- Pini M, Fantuzzi G. Enhanced production of IL-17A during zymosan-induced peritonitis in obese mice. *J Leukoc Biol.* 2010 Jan; 87(1):51-8.
- Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV, Phillips LK, Goldstein MJ, Bhat R, Raine CS, Sobel RA, Steinman L. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 1;106(35):14948-53.
- Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, Leoni P, Khan K, Rajkumar VS, Hoyle RK, Bou-Gharios G, Black CM, Denton CP, Abraham DJ, Leask A, Lindahl GE. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(7):2142-55.
- Qian X, Houheng S, Jiajia C, Bin W. Role of Treg Cells and TGF-β1 in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Possible Relation with Lupus Nephritis. *Immunological Investigations* 2012; 41:15–27.
- Qian Y, Liu C, Hartupée J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, Xiao J, Lu Y, Giltaiy N, Liu J, Kordula T, Zhang QW, Vallance B, Swaidani S, Aronica M, Tuohy VK, Hamilton T, Li X.. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature immunology* 2007;8:247–256.
- Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimbürger O, Lindholm B, Bergström J. Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(Suppl 1):S28–36.
- Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm.* 2005;70:69-103. Review
- Rachitskaya AV, Hansen AM, Horai R, Li Z, Villasmil R, Luger D, Nussenblatt RB, Caspi RR. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORγ and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol.* 2008 Apr 15;180(8):5167-71.
- Raz E, Dudler J, Lotz M, Baird SM, Berry CC, Eisenberg RA, Carson DA. Modulation of disease activity in murine systemic lupus erythematosus by cytokine gene delivery. *Lupus.* 1995 Aug; 4(4):286-92.
- Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest.* 2006; 116(2):288-96.

- Reynolds J. Strain differences and the genetic basis of experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Int. J. Exp. Path.* 2011, 92, 211–217
- Ribeiro SM, Poczaek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1999; 274: 13586–13593.
- Riser BL, Cortes P, DeNichilo M, Deshmukh PV, Chahal PS, Mohammed AK, Yee J, Kahkonen D.. Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report. *Kidney Int* 2003; 64(2):451-458.
- Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL.  $\gamma\delta$  T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol.* 2008 Jun;20(3):353-7.
- Roberts GW, Baird D, Gallagher K, Jones RE, Pepper CJ, Williams JD, Topley N. Functional effector memory T cells enrich the peritoneal cavity of patients treated with peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Sep;20(9):1895-900.
- Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK: Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 2003;112(9):1342-50,
- Rodrigues Díez R, Rodrigues-Díez R, Lavoiz C, Rayego-Mateos S, Civantos E, Rodríguez-Vita J, Mezzano S, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. Statins inhibit angiotensin II/Smad pathway and related vascular fibrosis, by a TGF- $\beta$ -independent process. *PLoS One.* 2010 Nov 30;5(11):e14145.
- Rodrigues-Díez R, Carvajal-González G, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Rodrigues Díez R, Selgas R, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways. *Pharm Res.* 2008; 25(10):2447-61.
- Rodríguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Sanchez-López E, Plaza JJ, Egido J. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005 Jul 22;97(2):125-34.
- Rodríguez-Vita J, Sánchez-Galán E, Santamaría B, Sánchez-López E, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio LM, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M. Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. *PLoS One.* 2008;3(12):e3959.
- Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Esteban V, Rupérez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation.* 2005 May 17;111(19):2509-17.
- Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol.* 2009 Nov;47(1):3-7.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115–26.

- Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, Gaffen SL. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by CCAAT/enhancer binding protein family members. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279:2559–2567.
- Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2007; 74(2):196-206.
- Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, Egido J. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(1):16-20.
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl* 2002;12-22
- Rupérez M, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio LM, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Esteban V, Carvajal G, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/Rock and MAPK pathway. *Hypertension* 2007; 50:377-83.
- Rupérez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am J Pathol* 2003; 163:1937-47.
- Ryan ST, Koteliansky VE, Gotwals PJ, Lindner V. Transforming growth factor-beta-dependent events in vascular remodeling following arterial injury. *J Vasc Res*. 2003 Jan-Feb;40(1):37-46.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev*. 2006; 212: 8–27.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995; 155: 1151-1164.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.
- Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbí A, Attisano L, Bernabéu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- $\beta$  pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J. Biol. Chem*. 2001; 276, 38527–38535
- Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez R, Rodríguez JS, Rodrigues-Díez R, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Aroeira LS, Selgas R, Mezzano SA, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20(7):1513-26.
- Sánchez-López E, Rodrigues Díez R, Rodríguez Vita J, Rayego Mateos S, Rodrigues Díez RR, Rodriguez Garcia E, Lavoiz Barria C, Selgas R, Mezzano S, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M. Connective tissue

- growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage. *Nefrologia*. 2009; 29(5):382-91.
- Santibáñez JF, Quintanilla M, Bernabéu C. TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 2011; 121, 233–251
  - Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Aug;21(8):1254-62
  - Saxena R, Toto RD. Approach to the patient with kidney disease. In: Brenner BM (ed). *Brenner and Rector's The Kidney*, 8th edn. 2008. Saunders Elsevier: Philadelphia.
  - Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:141–147.
  - Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 152–176,
  - Selgas R, del Peso G, Sánchez-Villanueva R, Aroeira LS, González-Mateo G, Loureiro J, Portolés J, Remón C, Fernández Perpén A, Sánchez Tomero JA, Jiménez-Heffernan J, Bajo MA. Actualidades en diálisis peritoneal:del laboratorio a la clínica.*Nefrología* 2009;29(Sup. Ext. 5):68-73.
  - Sergejeva S, Ivanov S, Lötvall J, Lindén A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33(3):248-253.
  - Shahrara S, Pickens SR, Dorfleitner A, Pope RM. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2009;182(6):3884-3891
  - Shankland SJ, Pippin J, Pichler RH, Gordon KL, Friedman S, Gold LI, Johnson RJ, Couser WG. Differential expression of transforming growth factor-beta isoforms and receptors in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 1996 50: 116–124.
  - Sharma K, Jin Y, Guo J, and Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996. 45: 522–530.
  - Shen F, Li N, Gade P, Kalvakolanu DV, Weibley T, Doble B , Woodgett JR , Wood TD, Gaffen SL. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBP $\beta$  by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci Signal*. 2009; 2(59):ra8.
  - Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195-201.
  - Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113, 685–700
  - Shimizu H, Maruyama S, Yuzawa Y, Kato T, Miki Y, Suzuki S, Sato W, Morita Y, Maruyama H, Egashira K, Matsuo S. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1496–1505,



- Sisco M, Kryger ZB, O'Shaughnessy KD, Kim PS, Schultz GS, Ding XZ, Roy NK, Dean NM, Mustoe TA. Antisense inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mRNA limits hypertrophic scarring without affecting wound healing in vivo. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):661-73.
- Smith E, Prasad KM, Butcher M, Dobrian A, Kolls JK, Ley K, Galkina E. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2010;121(15):1746-1755.
- Spagnoli A, Longobardi L, O'Rear L. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells. *Endocr Dev* 2005; 9:17–30.
- Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*. 2007;13(2):139-45
- Steinman L. Mixed results with modulation of TH-17 cells in human autoimmune diseases. *Nat Immunol*. 2010; 11(1):41-4.
- Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrology (Carlton)*. 2006 Feb;11(1):36-41.
- Summers SA, Steinmetz OM, Li M, Kausman JY, Semple T, Edgton KL, Borza DB, Braley H, Holdsworth SR, Kitching AR. Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2518–2524.
- Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F191–F198.
- Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius red F3Ba as a stain for connective tissue. *Arch Pathol*. 1964 Jul; 78:69-72.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100, 655–669.
- Tam FW, Riser BL, Meeran K, Rambow J, Pusey CD, Frankel AH. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and connective tissue growth factor (CCN2) as prognostic markers for progression of diabetic nephropathy. *Cytokine* 2009;47(1):37-42
- Tang SC, Leung JC, Lai KN. Diabetic tubulopathy: an emerging entity. *Contrib Nephrol*. 2011; 170:124-34.
- Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol*. 2008; 9(2):194-202.
- Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int*. 2010 Jun; 77(12):1070-5.
- USRDS. United State Renal Data System. Patient mortality and survival. *Am J Kidney Dis*. 1997 Aug;30(2 Suppl 1):S86-106.



- Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, Bruijn JA, De Fijter JW, Van Es LA, Daha MR. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1526–1534.
- Velden J, Paust HJ, Hoxha E, Turner JE, Steinmetz OM, Wolf G, Jabs WJ, Ozcan F, Beige J, Heering PJ, Schröder S, Kneissler U, Disteldorf E, Mittrücker HW, Stahl RA, Helmchen U, Panzer U. Renal IL-17 expression in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Mar 21.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89.
- Vielhauer V, Eis V, Schlondorff D, Anders HJ. Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: Lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27: 226–238,
- Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR, Liu YJ.. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 4793–4798.
- Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto H, Ishiwata Y, Mukaida N, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H. Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 940–948,
- Wang AY, Wang M, Woo J, Lam CW, Li PK, Lui SF, Sanderson JE. Cardiac valve calcification as an important predictor for all-cause mortality and cardiovascular mortality in long-term peritoneal dialysis patients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jan;14(1):159-68.
- Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, Lin A, Yeowell D. Cooperative interaction of CTGF and TGF-β in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011; 4(1):4.
- Wang S, Jiang J, Guan Q, Lan Z, Wang H, Nguan CY, Jevnikar AM, Du C. Reduction of Foxp3-expressing regulatory T cell infiltrates during the progression of renal allograft rejection in a mouse model. *Transpl Immunol*. 2008; 19(2):93-102.
- Wang W, Huang XR, Li AG, Liu F, Li JH, Truong LD, Wang XJ, Lan HY. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(5):1371-83.
- Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)*. 2005; 10(1):48-56.
- Wang X, McLennan SV, Allen TJ, Twigg SM. Regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors by CCN2/CTGF in H9c2 cardiomyocytes. *J Cell Commun Signal*. 2010; 4(1):15-23.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006 Jun;24(6):677-88.

- Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and Treg cell lineages: a (co-) evolutionary perspective. *Nat. Rev. Immunol* 2009; 9: 883–889.
- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. X- linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001; 27: 18-20.
- Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, Mackenzie RK, Williams GT; Peritoneal Biopsy Study Group. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13(2):470-9.
- Witowski J, Ksiazek K, Warnecke C, Kuźlan M, Korybalska K, Tayama H, Wiśniewska-Elnur J, Pawlaczyk K, Trómińska J, Breborowicz A, Jörres A. Role of mesothelial cell-derived granulocyte colony-stimulating factor in interleukin-17-induced neutrophil accumulation in the peritoneum. *Kidney Int*. 2007; 71(6):514-25.
- Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, Scheuren A, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wisniewska J, Polubinska A, Friess H, Gahl GM, Frei U, Jörres A. IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J Immunol*. 2000 15;165(10):5814-21.
- Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, Mayer G, Gunsilius E, Rosenkranz AR: CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2005;16 : 1360 –1370,
- Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest*. 2004 Dec;34(12):785-96.
- Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ, Tomkinson KN, Fitz LJ, Wolfman NM, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K, Chatterjee-Kishore M, Carreno BM. The Human IL-17F/IL-17A Heterodimeric Cytokine Signals through the IL-17RA/IL-17RC Receptor Complex. *The Journal of Immunology* 2008; 181, 2799 -2805
- Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem*. 2007; 282:1 3447– 55.
- Wu SH, Lu C, Dong L, Chen ZQ. Signal transduction involved in CTGF induced production of chemokines in mesangial cells. *Growth Factors*. 2008; 26(4):192-20.
- Xie JJ, Wang J, Tang TT, Chen J, Gao XL, Yuan J, Zhou ZH, Liao MY, Yao R, Yu X, Wang D, Cheng Y, Liao YH, Cheng X. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice. *Cytokine*. 2010 Feb; 49(2):185-93.
- Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4 + CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007; 178:6725–9.

- Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, and Border WA. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1996; 49: 461–469.
- Yang MH, Lin BR, Chang CH, Chen ST, Lin SK, Kuo MY, Jeng YM, Kuo ML, Chang CC. Connective tissue growth factor modulates oral squamous cell carcinoma invasion by activating a miR-504/FOXP1 signalling. *Oncogene*. 2011 Sep 19. doi: 10.1038/onc.2011.423.
- Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008;29:44–56.
- Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, Hirahara K, Sun HW, Wei L, Vahedi G, Kanno Y, O'Shea JJ, Laurence A. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT-3 and STAT5. *Nat Immunol*. 2011; 12(3):247-54.
- Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A, Gamallo C, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. Peritoneal dialysis induces an epithelial-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348:403–13.
- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JJ, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995; 3:811–821.
- Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, Laurence A, Robinson GW, Shevach EM, Moriggl R, Hennighausen L, Wu C, O'Shea JJ. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood*. 2007; 109(10):4368-75.
- Yokoi H, Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int* 2008;73:446–455
- Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Nishida T, Takigawa M, Sugawara A, Nakao K. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jun;15(6):1430-40.
- Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, Suganami T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*; 2002; 282(5):F933-42.
- Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND. Naïve and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2006;70(2):371-6.
- Zamauskaite A, Perez-Cruz I, Yaqoob MM, Madrigal JA, Cohen SB. Effect of renal dialysis therapy modality on T cell cytokine production. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Jan;14(1):49-55.
- Zemel D, Krediet RT. Cytokine patterns in the effluent of continuous ambulatory peritoneal dialysis: relationship to peritoneal permeability. *Blood Purif*. 1996;14(2):198-216.

- Zemel D, ten Berge RJ, Koomen GC, Struijk DG, Krediet RT. Serum interleukin-6 in continuous ambulatory peritoneal dialysis in patients. *Nephron* 1993; 64:320–1.
- Zhang C, Meng X, Zhu Z, Yang X, Deng A. Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro. *Life Sci* 2004; 75:367-79.
- Zhang J, Hua G, Zhang X, Tong R, DU X, Li Z. Regulatory T cells/T-helper cell 17 functional imbalance in uraemic patients on maintenance haemodialysis: a pivotal link between microinflammation and adverse cardiovascular events. *Nephrology (Carlton)*. 2010;15(1):33-41.
- Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res*. 2009; 19, 128–139
- Zhang Z, Kyttaris VC, Tsokos GC. The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J Immunol* 2009; 183: 3160–3169.
- Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol*. 2002 Oct 15;169(8):4183-9.
- Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89, 587–596.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR.. TGF-b-induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing RORgt function. *Nature* 2008; 453: 236–240.
- Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112:1557–1569.
- Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sc USA* 2000; 97: 8015–8020.
- Zoccali C, Goldsmith D, Agarwal R et al. The complexity of the cardio–renal link: taxonomy, syndromes, and diseases. *Kidney Int Sup* 2011; 1: 2–5.
- Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:295–307.



## ***VIII. ANEXOS***



Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones.

[Publicaciones científicas realizadas en revisión, enviadas a publicar o en fase de redacción](#)

**The C-terminal module of connective tissue growth factor induces sustained inflammation in the kidney via local IL-17A production.**

Raquel Rodrigues-Díez, Raúl Rodrigues Díez, Sandra Rayego-Mateos, Carolina Lavoiz, Luiz Stark Aroeira, Elsa Sánchez-López, Macarena Orejudo, Matilde Alique, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Marta Ruiz-Ortega  
Sometido a publicación en Lab. Investigation.

**IL-17A: a novel player in the peritoneal membrane damage by dialysis treatment.**

Raquel Rodrigues-Díez, Luiz Stark Aroeira, José Jiménez Heffernan, Raul R. Rodrigues-Díez, Sandra Rayego, M-Auxiliadora Bajo, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Manuel López-Cabrera, Rafael Selgas, Marta Ruiz-Ortega.

En fase de redacción.

**TGF- $\beta$  blockade enhances experimental renal inflammatory by Treg modulation.**

Raquel Rodrigues-Díez, Sandra Rayego-Mateos, Raúl Rodrigues Díez, Carolina Lavoiz, Matilde Alique, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Marta Ruiz-Ortega.

En fase de redacción.

[Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas](#)

Poster

**CTGF participates in the chronic inflammatory response in the kidney by the activation of Th17 response.** Raquel Rodrigues-Díez, Carolina Lavoiz Barría, Elsa Sánchez-López, Raúl Rodrigues Díez, Sandra Rayego Mateos, Esther Civantos, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Marta Ruiz-Ortega. ISN Nexus Symposia. Fibrosis and the Kidney: Emerging Culprits in Pathogenesis and Advances in Therapy. 30 June - 2 July 2010 - Geneva, Switzerland

**IL-17: A Novel Player in Peritoneal Dialysis Treatment.** Marta Ruiz-Ortega, Raquel Rodrigues-Díez, Luiz S Aroeira, José A Jiménez, Raúl R Rodrigues Díez, Sandra Rayego-Mateos, Guadalupe González- Mateo, Manuel López-Cabrera, Jesús Egido, MD, Alberto Ortiz, Rafael Selgas. ASN Kidney Week 2011 Annual Meeting. November 10-13 in Philadelphia, PA.

**Connective Tissue Growth factor (CTGF) induces a chronic Th17 inflammatory response in the kidney.**

Raquel Rodrigues-Díez, Raúl R Rodrigues Díez, Sandra Rayego-Mateos, Carolina Lavoiz, Matilde Alique aguilar, Alberto Ortiz, Jesus Egido, Marta Ruiz-Ortega. ASN Kidney Week 2011 Annual Meeting. November 10-13 in Philadelphia, PA.

**IL-17: un nuevo mediador en las complicaciones del tratamiento por diálisis peritoneal.** Raquel Rodrigues Díez, Luiz Stark Aroeira - José Jimenez Heffernan, Sandra Rayego-Mateos, Raúl Rodrigues Díez,

Guadalupe Gonzalez-Mateo, Maria Auxiliadora Bajo, Alberto Ortiz, Rafael Selgas, Marta Ruiz-Ortega. XLI Congreso Nacional de la SEN, Sevilla, España. Octubre 2011.

**Connective tissue growth factor induces a sustained inflammatory response in the kidney and vessels via local interleukin 17A production.**

Raquel Rodrigues-Díez, Raúl Rodrigues-Díez, Sandra Rayego-Mateos, Carolina Lavozy, Luiz Guilherme Stark Aroeira, Macarena Orejudo, Matilde Alique, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Marta Ruiz-Ortega.

49th ERA-EDTA Congress, Paris, France (May 24-27, 2012). Premio ERA/EDTA autor joven al mejor abstracto de su categoría.

**ePoster**

**Papel del factor de crecimiento de tejido conectivo CTGF en la progresión de la respuesta inflamatoria renal. Ruta de ERK1/2 y de NF-kappa B.** Raquel Rodrigues-Díez, Elsa Sánchez-López, Sandra Rayego, Raúl Rodrigues-Díez, Carolina A. Lavozy-Barria, Elena Rodríguez-García, Jesús Egido, Alberto Ortiz, Marta Ruiz-Ortega. XXXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Pamplona. Octubre de 2009.

**Comunicaciones orales**

**El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) modula la ruta Smad activando Smad2 de manera independiente de TGF-beta. Posible papel de esta ruta en la inflamación vascular.** Macarena Orejudo del Río, Raúl Rodrigues Díez, Raquel Rodrigues Díez, Matilde Alique Carolina Lavozy Sandra Rayego Mateos José Luis Morgado Pascual Alberto Ortiz Jesús Egido, Marta Ruiz Ortega. 17 Reunión Nacional SEH-LELHA, Madrid, 2012.

**Interleukin IL-17A: a novel player in peritoneal injury by dialysis.** Raquel Rodrigues-Díez, Luiz Guilherme Stark Aroeira, José A. Jiménez, Raúl Rodrigues-Díez, Sandra Rayego-Mateos, Auxiliadora Bajo Rubio, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Manuel López-Cabrera, Rafael Selgas, Marta Ruiz-Ortega. 49th ERA-EDTA Congress, Paris, France (May 24-27, 2012). Travel Grant.

Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis.

**Statins inhibit angiotensin II/Smad pathway and related vascular fibrosis, by a TGF- $\beta$ -independent process.** Rodrigues Díez R, Rodrigues-Díez R, Lavozy C, Rayego-Mateos S, Civantos E, Rodríguez-Vita J, Mezzano S, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. PLoS One. 2010 30;5(11):e14145.

**Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage.** Sánchez-López E, Rodrigues Díez R, Rodríguez Vita J, Rayego Mateos S, Rodrigues Díez RR, Rodríguez García E, Lavozy Barria C, Mezzano S, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Selgas R. Nefrologia. 2009;29(5):382-91. doi: 10.3265

**CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB.** Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez R, Rodríguez JS, Rodrigues-Díez R, Rodríguez-Vita J, Carvajal



G, Aroeira LS, Selgas R, Mezzano SA, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1513-26.

**Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation.**

Rodríguez-Vita J, Sánchez-Galán E, Santamaría B, Sánchez-López E, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio LM, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M. *PLoS One*. 2008;3(12):e3959.

**Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways.**

Rodrigues-Díez R, Carvajal-González G, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Rodrigues Díez R, Selgas R, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. *Pharm Res*. 2008;25(10):2447-61.

**Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation.**

Carvajal G, Rodríguez-Vita J, Rodrigues-Díez R, Sánchez-López E, Rupérez M, Cartier C, Esteban V, Ortiz A, Egido J, Mezzano SA, Ruiz-Ortega M. *Kidney Int*. 2008;74(5):585-95.

**Inhibitory effect of interleukin-1beta on angiotensin II-induced connective tissue growth factor and type IV collagen production in cultured mesangial cells.**

Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Cartier C, Rupérez M, Esteban V, Carvajal G, Rodrigues-Díez R, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(1):F149-60.

**HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways.**

Rupérez M, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio LM, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Esteban V, Carvajal G, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. *Hypertension*. 2007;50(2):377-83.